

**Untersuchung der natürlichen Variation der  
Metalltoleranz von *Arabidopsis thaliana* Ökotypen  
und Identifikation von Genen verantwortlich für  
Toleranzunterschiede**

**Dissertation**

zur Erlangung des Akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

Eingereicht an der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und  
Naturwissenschaften (BayNAT)

vorgelegt von  
Sina Fischer

September 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis September 2014 in Bayreuth am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Stephan Clemens angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Teile dieser Arbeit sind publiziert: DOI 10.1021/es405234p [1]

Dissertation eingereicht am: 30.9.2014

Zulassung durch Leitungsgremium: 7.10.2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 13.2.2015

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss

Prof. Dr. Stephan Clemens	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Olaf Stemmann	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Benedikt Westermann	(Vorsitz)
Prof. Dr. Heike Feldhaar	



## Zusammenfassung

Die Bewegung von Schwermetallen in pflanzlichen Systemen, die Aufnahme, Verteilung, Verwendung als Co-Faktor oder Strukturgeber in Enzymen, kurz die Metallhomöostase ist noch lange nicht ausreichend untersucht. Neue Komponenten können durch die Analyse der Schwermetalltoleranz identifiziert werden da Proteine und Gene, welche eine Funktion in der Toleranz erfüllen, häufig auch eine Rolle für die basale Aufnahme, Verteilung oder Lagerung von Schwermetallen haben. In dieser Arbeit sollte die Untersuchung der natürlichen Variation in der Schwermetalltoleranz der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) genutzt werden, um solche Komponenten zu identifizieren. Es wurden zink- und cadmiumtolerante Ökotypen mit weniger toleranten verglichen und Gene identifiziert, die an der Ausprägung dieser Toleranz beteiligt sein könnten. Dabei konnten für At1G23040 vermehrt Hinweise detektiert werden, die es in der höheren Zn-Toleranz von dem Ökotyp Cvi-0 implizieren. Daneben wurde auch der erst kürzlich entdeckte Ökotyp Mwg-3 auf eine mögliche lokale Adaptation hin untersucht. Bei einer adaptiven Veränderung eines Ökotyps werden Mutationen aufgrund eines Selektionsvorteils im Genom fixiert, da sie zu einer höheren Fitness im natürlichen Habitat des Ökotyps führen. Für Mwg-3 wurde eine lokale Adaptation an den sauren, stark manganverfügbaren Boden seines natürlichen Habitates untersucht. Um die höhere Mn-Toleranz von Mwg-3 molekular aufklären zu können, wurde der Ökotyp sequenziert. Durch die Implementierung von Protokollen für die Identifikation von SNPs, die in Zusammenhang mit der Mn-Toleranz stehen, werden in Kürze auch Kandidatengene für die erhöhte Mn-Toleranz in Mwg-3 identifiziert werden können. Mit dem Ziel, auch die Effekte von Blei auf das Wachstum und auf physiologische Prozesse in Pflanzen in Zukunft besser untersuchen zu können, wurde ein neues Wachstumsmedium entwickelt. Dadurch konnten bisherige experimentelle Schwierigkeiten bei der Behandlung von Pflanzen mit Blei umgangen werden und erstmals die Relevanz von Phytochelatinen als Bleichelatoren und für die Bleitoleranz in Pflanzen, gezeigt werden.

## Summary

The movements of heavy metals in plant systems, their uptake, distribution, usage in active centers of enzymes or as structural components, in short the heavy metal homeostasis, is far from being completely understood. New components can be identified by the analysis of heavy metal tolerance since genes and proteins involved in the metal tolerance are often also part of the basal metal uptake, redistribution or storage systems. In this work, such components were to be found by exploiting the natural variation of heavy metal tolerance within the species thale cress (*Arabidopsis thaliana*). Zinc and Cadmium tolerant ecotypes were compared to less tolerant ones and candidate genes were identified, that could have an impact on the Zn and Cd tolerance. Evidence was collected which shows that the gene At1G23040 might be responsible for the higher Zn tolerance in the ecotype Cvi-0. A third ecotype, the newly discovered Mwg-3, was assessed for a potential adaptation to its natural habitat which features an acidic, highly manganese available soil. An adaptational change is a mutation which becomes fixed in the genotype of a population because it leads to a higher fitness of the individual in the habitat it is occurring in. To investigate the higher manganese tolerance of Mwg-3 molecularly the genome of the ecotype was sequenced. By implementing protocols to identify SNPs linked to the Mn tolerance genomic regions containing candidate genes will soon be identified. With the goal in mind to also study effects of lead on plant growth and physiological processes, a new medium was developed to enable lead treatment of plants. Thus experimental challenges which had prevented reliable investigations into lead-stress on plants could be circumvented. Employing the new medium, the involvement of phytochelatins in the chelation and detoxification of lead ions could be shown for the first time.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Stephan Clemens, für die Möglichkeit im Rahmen meiner Doktorarbeit an diesem spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Ich habe sehr von seiner Unterstützung und steten Diskussionsbereitschaft profitiert.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Michael Weber, für die Bereitstellung seines großen Erfahrungsschatzes sei es in Angelegenheiten der Wissenschaft oder Lehre.

Ich danke Prof. Dr. Angelika Mustroph für ihre Hilfe bei der Analyse der Microarray Daten und für ihr großes Interesse an meiner Arbeit im Allgemeinen.

Eine große Unterstützung waren meine beiden Langzeit-Bürokollegen Tanja Kühnlenz und Amelie Betzlbacher. Ich danke euch für eure Diskussionsbereitschaft, eure Geduld und für eure Unterstützung.

Ein Dank geht auch an alle Kollegen, die mich während meiner Promotion im Labor begleitet haben, für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit ebenso wie für die Hilfe bei den alltäglichen Verwaltungsproblemchen und die angenehme Atmosphäre im Laboralltag.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern. Ihr habt mir so vieles vermittelt, was ich als selbstverständlich betrachte und was mir das Arbeiten, egal in welchem Gebiet, unendlich erleichtert hat und es auch weiterhin tun wird. Danke, dass ihr für mich da seid.

Auch an Sie, den Leser dieser Dissertation, geht ein Dank für Ihr Interesse an meiner Arbeit und der Zeit die Sie damit dem spannenden Thema der natürlichen Variation in Pflanzen widmen. Ich wünsche Ihnen viel Spaß beim Lesen und hoffe, dass Sie durch diese Arbeit einen kleinen Einblick in die molekularen Untersuchungen von natürlicher Diversität bekommen.

<i>Allgemeine Einleitung</i> .....	11
1. Cadmium (Cd) .....	13
2. Zink (Zn) .....	15
3. Mangan (Mn) .....	17
4. Blei (Pb) .....	18
5. Bestandteile des Metallhomöostasenetzwerkes .....	19
5.1. Aufnahme aus der Rhizosphäre .....	20
5.2. Chelatierung in der Wurzel .....	22
5.3. Sequestrierung von Cd in die Wurzelvakuole .....	25
5.4. Translokation in den Spross .....	28
5.5. Natürliche Variation .....	30
Teil 1 .....	36
Ursachen der höheren Cadmiumtoleranz des <i>A. thaliana</i> Ökotyps Bur-0 .....	36
1. Einleitung .....	37
2. Ergebnisse .....	39
2.1. Vergleich von Bur-0 und Col-0 .....	39
2.2. QTL Mapping des Cadmiumtoleranzphänotyps .....	51
2.3. Eingrenzung des Intervalls auf Chromosom 5 .....	55
2.4. Eingrenzung des Anzahl der Kandidatengene durch Zuhilfenahme von Sequenzinformationen und veröffentlichter Microarrays .....	58
2.5. Bur-0 vs. Col-0 – der Microarray .....	61
2.5.1. Validierung des Microarrays .....	64
2.5.2. Microarray Auswertung .....	66
2.6. Das Kandidatengen HMA3 .....	88
3. Diskussion .....	91
Teil 2 .....	111
Ursachen der höheren Zinktoleranz des <i>A. thaliana</i> Ökotyps Cvi-0 .....	111
1. Einleitung .....	112
2. Ergebnisse .....	113
2.1. Phänotypisierung von Cvi-0 und Ler-0 .....	113
2.2. Mapping der Zinktoleranz von Cvi-0 .....	115
2.2.1. Eingrenzung der Region 1 .....	120
2.2.2. Region 2 .....	125
2.2.3. Komplementation der Zn-Sensitivität von Ler-0 durch Cvi-0 Gene .....	128
2.2.4. At1G23040 .....	129
3. Diskussion .....	136
Teil 3 .....	146
Ursachen der höheren Mangantoleranz des <i>A. thaliana</i> Ökotyps Mwg-3 .....	146
1. Einleitung .....	147
2. Ergebnisse .....	150
2.1. Säuretoleranz von Mwg-3 im 6-well Flüssigsystem .....	150
2.2. Aluminiumtoleranz von Mwg-3 im 6-well Flüssigsystem .....	151
2.3. Phosphateffizienz von Mwg-3 .....	154
2.4. Mangantoleranz von Mwg-3 .....	155
2.4.1. Mapping der Mn-Toleranz mittels BSA .....	157
2.4.2. Mapping der Mn-Toleranz mittels „Next Generation Sequencing“ (NGS) .....	158
3. Diskussion .....	163
Teil 4 .....	174

Phytochelatine vermitteln Bleitoleranz bei sub-mikromolaren Konzentrationen .....	174
1. Einleitung.....	175
2. Ergebnisse.....	177
2.1. Pb Verfügbarkeit und Toxizität in Standardwachstumsmedien .....	177
2.2. Test eines neuen Wachstumsmediums zur Erfassung der Pb Toleranz unter umweltrelevanten Bedingungen.....	182
2.3. Theoretischer Vergleich der drei Wachstumsmedien mit <i>Vminteq</i> .....	184
2.4. Cd Toleranz im LPP Medium und Vergleich mit toxischen Konzentrationen anderer Systeme .....	185
2.5. Vergleich der Metallprofile von Pb gestressten, 9 Tage alten Keimlingen in den drei Medien .....	186
2.6. Aktivierung der Phytochelatinsynthese durch Blei .....	188
2.7. Bleitoleranz und Metallprofil älterer Pflanzen im gering Phosphat/gering pH Medium .....	191
2.8. Bleitoleranz von Phytochelatinsynthese defizienten Hefen .....	194
3. Diskussion.....	195
<i>Materialien und Methoden</i> .....	205
1. Materialien .....	205
1.1. Wachstumsmedien.....	205
1.2. Chemikalien, Oligonukleotide, Enzyme.....	205
1.3. Organismen und Plasmide .....	206
2. Methoden.....	207
2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	207
2.2. Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i> .....	207
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	207
2.3.1. Wachstumstest.....	207
2.3.2. Überlebenstest.....	208
2.4. Kultivierung von <i>A. thaliana</i> .....	208
2.4.1. Pflanzenanzucht in Erde.....	208
2.4.2. Pflanzen Wachstumstest auf festem Medium .....	208
2.4.3. Pflanzen Wachstumstest in Flüssigmedium - das Falconsystem .....	209
2.4.4. Pflanzenanzucht in 6-well Platten .....	210
2.5. Allgemeine Mikrobiologische Methoden.....	210
2.5.1. gDNA Isolation.....	211
2.5.2. gDNA Isolation – Quick Prep Methode .....	211
2.5.3. gDNA Isolation – CTAB Methode, Fragmentierung und Markierung .....	211
2.5.4. PCR Reaktionen .....	213
2.5.5. PCR Aufreinigung.....	214
2.5.6. Klonierungen .....	214
2.5.7. <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> Transformation .....	215
2.5.8. <i>A. thaliana</i> Transformation .....	215
2.5.9. <i>N. tabacum</i> Transformation.....	216
2.5.10. RNA Isolation .....	216
2.5.11. cDNA Synthese mit Fermentas.....	216
2.5.12. quantitative <i>Real Time</i> PCR .....	217
2.5.13. RT-PCR .....	217
2.5.14. Primer .....	217
2.6. Erdexperimente.....	218

2.7. Microarray .....	219
2.8. <i>Bulk Segregant Analysis</i> (BSA) .....	220
2.9. Proteinbiochemische Methoden .....	220
2.9.1. Isolation .....	220
2.9.2. Proteinkonzentrationsbestimmung .....	221
2.9.3. SDS Gel .....	221
2.9.4. Proteinaktivitätstest .....	221
2.10. PC Quantifizierungen .....	222
2.10.1. via HPLC .....	222
2.10.2. via LC-MS .....	222
2.11. <i>Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry</i> (ICP-OES) .....	223
2.11.1. Vermessung von Lösungen .....	224
2.11.2. Vermessung von Pflanzenproben .....	224
2.12. Mikroskopie und Färbungen .....	224
2.13. Statistische Analysen .....	225
<i>Literaturverzeichnis</i> .....	226
<i>Anhang</i> .....	246

**AFLP** *amplified fragment length polymorphism*

**AGI** *Arabidopsis thaliana* Gene Index

**AGP** *arabinogalactan-proteins*

**AS** Aminosäure

**ATP** Adenosin-5'-Triphosphat

**BSA** *Bulk Segregant Analysis*

**γEC** Gamma-Glutamylcystein

**CAPS** *cleaved amplified polymorphic sequences*

**cDNA** *complementary DNA*

**cRNA** *complementary RNA*

**dATP** 2'-Deoxyadenosin-5'-Triphosphat

**DTT** Dithiothreitol

**dTTP** 2'-Deoxythymidin-5'-Triphosphat

**dUTP** 2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat

**EDTA** Ethylendiamintetraacetat

**EST** *expressed sequence tag*

**GFP** *green fluorescent protein*

**GSH** Glutathion

**GPI** Glycosylphosphatidylinositol

**GWAS** *genome wide association study*

**HA** Hämagglutinin

**HBED** N,N'-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylendiamin-N,N'-diacetat

**HEPES** N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure

**HMW** *high molecular weight*

**HRGP** *Hydroxyproline-rich glycoproteins*

**LB** *left border*

**LMW** *low molecular weight*

**LOD** *logarithmus of odds*

**LPP** *low Phosphate/ low pH* – gering Phosphat/ gering pH Medium

**MES** Morpholinoethansulfonsäure

**MOPS** Morpholinopropansulfonsäure

**MS** Murashige-Skoog

**MT** Metallothionein

**NA** Nicotianamin

**NGS** *next generation sequencing*

**NIL** *near isogenic line*

**PC** Phytochelatin

**PCR** *polymerase chain reaction*

**PMSF** Phenylmethylsulfonylfluorid

**QTL** *Quantitative Trait Loci*

**r** Pearsonscher Korrelationskoeffizient

**RB** *right border*

**RIL** *recombinant inbreed line*

**RT** Raumtemperatur

**RT-PCR** *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

**ROS** *reactive oxygen species*

**SDS** *sodiumdodecylsulfate*

**SNP** *single nucleotide polymorphism*

**ssp.** Subspezies

**T-DNA** Transfer-DNA

**TEMED** N,N,N',N'-

Tetramethylethylendiamin

**Tg** Trockengewicht

**UV** Ultraviolett

**WGS** *whole genome sequencing*

Abb. 1: Die weltweit häufigsten Todesursachen bei Männern und Frauen.....	13
Abb. 2: Schematische Darstellung der Aufnahme von Schwermetallen.....	21
Abb. 3: Schematische Darstellung der Bildung von PCs.....	23
Abb. 4: Schematische Darstellung des Metalltransportes über den Tonoplast.....	26
Abb. 5: Schematische Darstellung der Translokation von Schwermetallen.....	29
Abb. 6: Erfassung des Wachstumsunterschiedes von Bur-0 und Col-0 Keimlingen bei steigendem Cd-Stress. ....	39
Abb. 7: Erfassung des Wachstumsunterschiedes von Bur-0 und Col-0 Keimlingen bei steigendem Zn-Stress. ....	40
Abb. 8: Korrelation der Cd und der Zn Toleranz .....	41
Abb. 9: Wachstum und Metallgehalte der <i>A. thaliana</i> Ökotypen Bur-0 und Col-0 auf Zn-kontaminierter Erde. .	42
Abb. 10: Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 1-wöchiger Behandlung mit zunehmenden CdCl <sub>2</sub> Konzentrationen.....	44
Abb. 11: Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 1-wöchiger Behandlung mit zunehmenden ZnSO <sub>4</sub> Konzentrationen.....	45
Abb. 12: Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 3-wöchiger Behandlung mit zunehmenden CdCl <sub>2</sub> Konzentrationen.....	47
Abb. 13: Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 3-wöchiger Behandlung mit zunehmenden ZnSO <sub>4</sub> Konzentrationen.....	48
Abb. 14: Quantifizierung der Phytochelatin Gehalte in Pflanzen des Microarrays.....	50
Abb. 15: Vergleich des Wachstums von Bur-0 und Col-0 unter Schwefelmangel.....	51
Abb. 16: Vergleichende Darstellung des rel. Wurzelwachstums in einer Reihe mit dem in 2 Reihen auf Agarplatten unter 2 µM CdCl <sub>2</sub> .....	52
Abb. 17: Histogramme zeigen die Verteilung des rel. Wurzelwachstums (A) und des rel. Keimlingsgewichtes unter Cd-Stress.....	53
Abb. 18: Ergebnis der Korrelation der relativen Wurzellängen mit den Genotypen der RIL's auf Chromosom 5 durch das Programm MapQTL5 ®. ....	54
Abb. 19: Wachstum von RV243 vergleichend mit Col-0 und Bur-0. ....	56
Abb. 20: Wachstumsverteilung der T Linien unter 2 µM CdCl <sub>2</sub> .....	58
Abb. 21: Darstellung der Blattflächen von Bur-0 und Col-0 nach 7 Tagen Cd-Behandlung .....	62
Abb. 22: Phänotypisierung der Microarraypflanzen .....	63
Abb. 23: Bestätigung der Microarray Daten. ....	64
Abb. 24: Schematische Darstellung der Schwefelassimilation.....	65
Abb. 25: Schnittmenge der Gene des QTL Bereiches mit spezifischer Regulation als Venn-Diagramm. ....	68
Abb. 26: Hierarchische Clusteranalyse der differentiell regulierten Gene im QTL.....	69
Abb. 27: Vergleich responsiver Gene des QTL Bereiches mit Daten von Herbette <i>et al.</i> 2006.....	70
Abb. 28: Genomweite Analyse der Transkription durch eine BIN-Gruppen Überrepräsentationsanalyse. ....	72
Abb. 29: Graphische Darstellung der Clusteranalyse (Hierarchisches Clustering) der 2651 mindestens 2fach durch Cd in ihrer Expression veränderten Gene. ....	74
Abb. 30: Hierarchische Clusteranalyse der Metallhomöostasegene .....	87
Abb. 31: Cd-Toleranz von AtHMA3 <sub>Bur-0</sub> transgenen Linien.....	89
Abb. 32: Wurzelwachstum der <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotypen Ler-0 und Cvi-0 auf Zn-kontaminiertem, festen Hoagland Medium.....	113
Abb. 33: Wurzelwachstum der <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotypen Ler-0 und Cvi-0 in flüssigem, Zn-kontaminierten Hoagland Medium.....	114
Abb. 34: Histogramm zeigt die Verteilung des rel. Wurzelwachstums unter den Ler-0/Cvi-0 RIL Linien .....	115
Abb. 35: Darstellung der Berechnung der wahrscheinlichen Lokalisierung des für den Cvi-0 Phänotyp verantwortlichen Genes mit dem Programm MapQTL5®.....	117
Abb. 36: Genauere Genotypisierung der interessanten X RILs in der QTL Region.....	118
Abb. 37: Sequenzalignment von Cvi-0 und Ler-0 .....	126
Abb. 38: Analyse der QTL Region 2 auf Chromosom 1. ....	127
Abb. 39: Partielle Komplementation des Ler-0 Phänotyps. ....	129
Abb. 40: Ein Ausschnitt aus dem Proteinalignment von At1G23040.....	130
Abb. 41: Sequenzvergleich der Core24 Ökotypen.....	132
Abb. 42: Lokalisation der beiden At1G23040 Varianten.....	134
Abb. 43: Standort von Mwg-3 .....	147
Abb. 44: Darstellung der Säuretoleranz von Mwg-3 .....	151
Abb. 45: Graphische Darstellung der Al-Toleranz von Mwg-3 .....	152
Abb. 46: Wurzelwachstum der <i>A. thaliana</i> Ökotypen Col-0, Ler-0 und Mwg-3 unter Phosphatmangel .....	154
Abb. 47: Wachstum von Mwg-3 unter Manganstress .....	155



Abb. 48: Graphische Darstellung des Wachstums von F1 Nachkommen der Kreuzung von Mwg-3 mit Col-0 oder Ler-0 unter 700 µM MnSO <sub>4</sub> .	156
Abb. 49: Graphische Darstellung des Wachstums von F2 Nachkommen der Kreuzung von Mwg-3 mit Col-0 ..	156
Abb. 50: Dokumentation der Entwicklung der <i>A. thaliana</i> Ökotypen Col-0, Mwg-3 und Hovdala-2.	159
Abb. 51: Vergleich der Mn-Toleranz von Mwg-3 und Hovdala-2.	160
Abb. 52: Resultat des SHOREmap Mappings der Mwg-3 Mn-Toleranz	161
Abb. 53: Verfärbung des 1/2 MS Mediums durch die Zugabe von Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .	177
Abb. 54: Vergleich der Bleiwiederfindungsrate	178
Abb. 55: Toxizität von Blei im 1/2 MS Medium.	180
Abb. 56: Toxizität von Blei im 1/10 Hoagland Medium.	181
Abb. 57: Toxizität von Blei im LPP Medium.	183
Abb. 58: Toxizität von Cadmium im LPP Medium.	186
Abb. 59: Analyse der Pb Akkumulation in Col-0 und PCS1 defekten Keimlingen.	187
Abb. 60: Mikronährstoffgehalt der Pb gestressten Keimlinge.	188
Abb. 61: <i>In vivo</i> Bildung von Phytochelatinen durch Pb-Behandlung.	189
Abb. 62: <i>In vitro</i> Aktivitätstest von AtPCS1	190
Abb. 63: Wachstum von 5 Wochen alten Col-0 Pflanzen und der <i>cad1</i> -Mutanten im LPP Medium.	192
Abb. 64: Metallprofile von 5-6 Wochen alten <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.	193
Abb. 65: Die Bleitoleranz eines PCS defizienten Hefestammes	194
Tab. 1: Charakterisierung der für die Erdexperimente verwendeten Erde	43
Tab. 2: Tendentielle Effekte der Cd- bzw. Zn-Behandlung auf die Metallgehalte	49
Tab. 3: Genotyp der für die weitere Eingrenzung des QTL Bereiches ausgewählten RILs.	55
Tab. 4: Detaillierter Genotyp der ausgewählten RILs	56
Tab. 5: Genotyp der T Linien	57
Tab. 6: Liste der in der QTL Region zu findenden Gene	59
Tab. 7: 3 Gene der auf Chromosom 5 eingegrenzten QTL Region	70
Tab. 8: Gene der QTL Region welche in Bur-0 durch Cd in ihrer Expression verändert sind.	71
Tab. 9: Schematische Darstellung des Expressionsverhalten der Gene (A) und Nebenclustern (B)	75
Tab. 10: Genen mit der jeweils höchsten Induktion/Repression	76
Tab. 11: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster I	78
Tab. 12: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster II	79
Tab. 13: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster III	79
Tab. 14: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster IV	82
Tab. 15: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster V	84
Tab. 16: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster VI	84
Tab. 17: Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Cluster 4 und 15	85
Tab. 18: Genotypen der interessanten X RILs in der Region der beiden QTLs	118
Tab. 19: Genauere Genotypisierung der interessanten X RILs	119
Tab. 20: Genotypisierung der Linien entstanden aus der F2 einer Kreuzung der RIL X124 mit Ler-0 (Z Linien)	121
Tab. 21: Genotypisierung der Nachkommen der Linie Z30	121
Tab. 22: Liste der Kandidatengene in Region 1 auf Chromosom 1 zwischen 6.3 und 6.9 Mb.	123
Tab. 23: Genauere Genotypisierung der RIL X118 in den QTL Regionen.	125
Tab. 24: Metallgehalte des Bodens am Fundort von Mwg-3	148
Tab. 25: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse	159
Tab. 26: Pb Fraktionen in den unterschiedlichen Wachstumsmedien	184
Tab. 27: Medienzusammensetzung.	206
Tab. 28: Verwendete Organismen und Vektoren	207

### **Allgemeine Einleitung**

Lebewesen benötigen nicht nur die Grundbausteine Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor, sondern auch eine ganze Reihe an Spurenelementen für ihre Stoffwechsel- und Wachstumsprozesse. Dazu gehören einige Schwermetalle, welche definiert sind als Elemente mit einer Dichte von mindestens  $5\text{g/cm}^3$  [2]. Schwermetalle sind katalytische oder strukturelle Bestandteile von Enzymen und Proteinen [3, 4]. Als Co-Faktoren werden die Schwermetalle nur in sehr geringen Mengen benötigt. Bei einem Überangebot erschöpfen sich die spezifischen Bindungspartner der Schwermetalle und diese können ungerichtet mit Molekülen interagieren und deren Funktionen behindern. Mehr noch als Tiere müssen die sessil lebenden Pflanzen deshalb die Metallaufnahme und -verteilung genau steuern. Dabei stellen sie sicher, dass die Versorgung mit den essentiellen Schwermetallen gewährleistet bleibt, gleichzeitig aber keine toxischen Konzentrationen erreicht werden. Dafür verfügt die Pflanze über ein komplexes Netzwerk an Mechanismen und Strategien. Zur Aufklärung der Transportnetzwerke trägt die Untersuchung von Metalltoleranz wesentlich bei. Proteine, die auf diesem Wege entdeckt wurden, sind neben ihrer Rolle bei der Bewältigung von zu großen Mengen an Metallen auch relevant für die Schwermetallhomöostase. Neben den essentiellen Schwermetallen (Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Cr, Mo, Co, B) müssen Pflanzen zudem die Aufnahme von nicht-essentiellen Schwermetallen (Cd, Pb, Hg und As) minimieren und aufgenommene Metallionen detoxifizieren.

Verschiedene Spezies zeigen große Unterschiede in ihrer Toleranz gegenüber Schwermetallen. Durch deren molekulare Untersuchung wird das Verständnis über den Metalltransports erweitert. Langfristig kann die Aufklärung dieser Netzwerke ein Eingreifen in die Verteilung der Schwermetalle innerhalb der Pflanze möglich machen und damit Nutzpflanzen für den menschlichen Gebrauch verbessern.

Ein Ziel ist es beispielsweise, essentielle Schwermetalle in essbaren Pflanzengewebe anzureichern (Biofortifikation). Es wird geschätzt, dass 60 % der Weltbevölkerung unter Eisendefizienz leiden, 30 % an Zink- und Ioddefizienz und 15 % an Selendefizienz. Auch Kalzium-, Magnesium- und Kupferdefizienzen treten häufig auf [5]. Dabei führt die Mangelerkrankung zu distinkten Symptomen. Beispielsweise bewirkt eine Eisendefizienz zunächst eine Reduktion der Eisenvorräte. Sind diese komplett aufgebraucht wird weniger

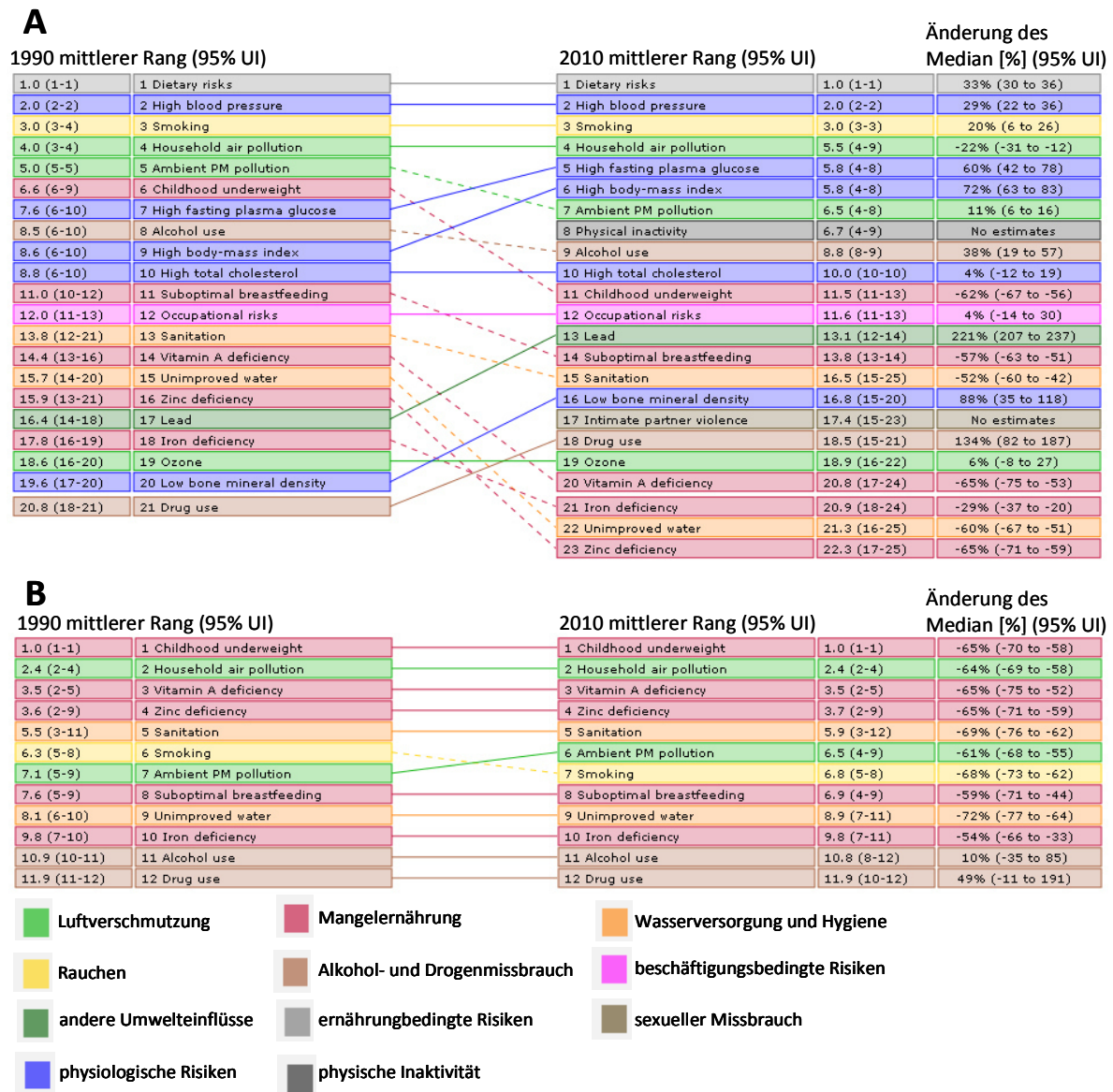
Eisen ans rote Knochenmark geliefert und es werden weniger rote Blutkörperchen gebildet. Epithelien des Gastrointestinaltraktes sind sehr anfällig gegenüber Eisenmangel. Zunge, Mund- und Magenschleimhaut entwickeln Entzündungen als Reaktion auf einen niedrigen Eisenstatus. Schwere Eisendefizienz führt schließlich zu Anämien, welche zuerst die Gehirnfunktionen beeinträchtigen und über längere Zeit zu irreversiblen Verhaltensänderungen führen [6]. Starke Zinkdefizienz dagegen führt zu Hautentzündungen, Durchfall, Alopezie (Haarausfall bis zur Haarlosigkeit), mentalen Störungen sowie sekundären Infektionen. Unbehandelt führt eine schwere Zn-Defizienz zum Tod. Symptome einer mittelschweren Zn-Defizienz sind dagegen Wachstums- und Entwicklungsstörungen, geistige Lethargie, Hautveränderungen und eine verzögerte Wundheilung. Diese Symptome sind häufiger in Entwicklungsländern bei Menschen mit einer proteinarmen Ernährung zu beobachten [7]. Leichte Zn-Defizienzen sind verbreiteter und führen zu einer Beeinträchtigung der Immunfunktion und zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit [8]. Um diesen Symptomen entgegen zu wirken ist eine Verbesserung der Nahrungsmittelqualität, vor allem in Regionen mit sehr einseitigen Diäten, entscheidend. Wie in Abb. 1 ersichtlich, gehört Zn-Mangel zu den 30 relevantesten Todesursachen beim Menschen, für Kleinkinder liegt er sogar auf Platz 4. Dies unterstreicht die Relevanz der Aufklärung der Transport- und Verteilungsmechanismen für Zink in Nutzpflanzen, um einerseits Erträge zu steigern und andererseits Mangelernährungen vorzubeugen.

Ein weiteres Ziel der Biofortifikation liegt darin, die Aufnahme toxischer Schwermetalle in die Nahrungskette weitestgehend zu reduzieren. Ein Beispiel dafür ist die intensive Forschung an der Entwicklung von Reiskultivaren, welche wenig Cadmium in den, von Menschen als Nahrungsmittel genutzten, Samen anreichern [9–13]. Der negative Effekt von Cadmium auf den Menschen reicht von akuten Symptomen wie: Kurzatmigkeit und Lungenödemen bei Inhalation sowie Erbrechen und Durchfall bei oraler Aufnahme, bis hin zu Langzeitfolgen durch regelmäßige Aufnahme von geringen Konzentrationen, zum Beispiel durch das Rauchen von Tabak. Diese umfassen: Nierenschäden, Effekte auf das Reproduktionssystem - die unter anderem zur Häufung von Fehlgeburten führen - und Schädigung des Skelettsystems welche häufige Knochenbrüche, Schmerzen der Knochen und eine geringe Knochenmineralisierung zur Folge haben (Itai-Itai Krankheit) [14].

Ein besseres Verständnis der Verteilungswege dieser Schwermetalle in der menschlichen Nahrungskette, setzt ein Verständnis der Metallhomöostase in Pflanzen voraus. Von diesen

werden die Schwermetalle aus dem Boden mobilisiert und damit für die tierische und menschliche Aufnahme verfügbar gemacht.

Im Folgenden soll auf die in der Arbeit näher betrachteten Metalle eingegangen werden.



**Abb. 1:** Die weltweit häufigsten Todesursachen bei Männern und Frauen (A) aller Altersstufen und der (B) 1-4 Jährigen in den Jahren 1990 und 2010. Hieran zeigt sich, dass Zn- und Fe-Defizienzen weltweit für ernsthafte gesundheitliche Probleme verantwortlich sind. Quelle: *Institute of Health Metrics and Evaluation* [15]

### 1. Cadmium (Cd)

Das nicht-essentielle Element Cadmium ist Mitglied der 12. Gruppe des Periodensystems (auch Zinkgruppe genannt) und liegt in Lösung als ein 2fach positiv geladenes Ion vor. Es hat

einen Atomradius von 155 pm. Beide Eigenschaften sind sehr ähnlich zu denen von Zink, welches ein benachbartes Atom der 10. Nebengruppe ist. Cadmium unterscheidet sich von Zink in seiner Atommasse, welche mit 112 u deutlich über der von Zink mit 65 u liegt. Es existiert in nur einem redox Zustand als  $\text{Cd}^{2+}$ . In der Zelle bewirkt es die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Des Weiteren bewirken die für die Pflanze recht ähnlichen physikalischen Eigenschaften der beiden Elemente die Aufnahme von Cd und die Inkorporation in Zn-bindende Proteine, welche dadurch in ihrer Funktion gestört werden. Die Symptome einer Cd-belasteten Pflanze umfassen neben einem geringeren Wachstum auch eine verringerte Photosyntheserate [16]. Cd ist in der Klassifikation von Smith *et al.* von 2002 [17] ein weiches Metall und vornehmlich mit Schwefelgruppen und weniger stark mit Stickstoff und Sauerstoff assoziiert. Für Bodenlösungen, in welchen N- und O-Gruppen in der Regel einen höheren Anteil haben als S-Gruppen, finden sich aber beide Assoziationen [18]. In Pflanzen wurde eine Cd-N/O Interaktion vor allem im Xylemsaft nachgewiesen [18], in Wurzel- und Blattmaterial war dagegen die Cd-S-Interaktion ersichtlich [19].

Der Cd-Gehalt in Oberböden reicht durchschnittlich von 0.01 bis 2.7  $\text{mg/kg}_{\text{Boden}}$ , wobei an kontaminierten Standorten auch mehr als 1000  $\text{mg/kg}_{\text{Boden}}$  erreicht werden können [20]. In Bodenlösungen nicht-kontaminierter Standorte kommt Cd in Spuren in Konzentrationen von 4.5 bis 36  $\mu\text{g/l}$  vor. In kontaminierten Böden werden Konzentrationen von 36 bis 112  $\mu\text{g/l}$  erreicht [21, 22]. Diese Kontaminationen sind hauptsächlich anthropogenen Ursprungs. Durch Abwässer, Phosphatdünger sowie bei der Metallverhüttung (hauptsächlich bei der Zink Herstellung) erfolgt ein Cd-Eintrag in die Umwelt [16].

Aufnahme von Cd-belasteten Nahrungsmitteln ist, neben der Inhalation von Cd-Partikeln oder der direkten Aufnahme von Cd aus Wasser oder Boden, die Hauptursache für die Belastung des Menschen. Dabei spielen wiederum pflanzliche Produkte eine größere Rolle [23]. Dadurch liegt weltweit die wöchentliche Cd-Aufnahme bei 3-4  $\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht, ein Wert, welcher die empfohlenen Obergrenzen der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) überschreitet. Diese Obergrenzen von 2.5  $\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht, ermittelt aus Meta-Analysen von Studien über frühe nachteilige Effekte von nicht berufsbedingter Cd-Exposition, geben Richtlinien, wie hoch die wöchentliche Belastung eines Menschen höchstens sein darf, um keine schädlichen Nachwirkungen bei einer Aufnahme und Anreicherung des Cd bis zum 50. Lebensjahr zu bewirken [20]. Die *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR) gibt sogar eine noch niedrigere Obergrenze

von nur 0.7 µg/kg Körpergewicht aufgrund einer niedrigeren Maximalbelastung mit Cd bei Erreichen des 50. Lebensjahres an [23]. Diese Zahlen belegen, dass eine Reduktion der Cd-Aufnahme über die pflanzlichen Nahrungsmittel erforderlich ist und demnach eine weitere Erforschung der Cd-Transport- und Akkumulationswege notwendig bleibt.

## 2. Zink (Zn)

Der Zinktoleranz von *Arabidopsis thaliana* Ökotypen ist der zweite Teil der vorliegenden Arbeit gewidmet. Zn wird als mittelhartes Metall klassifiziert [24] und besitzt dabei keine Präferenz für einen bestimmten Liganden. In Pflanzenwurzeln wurde eine Zn-N/O Interaktion nachgewiesen [25]. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass in einer zweiten Koordinationsebene multiple Streuungsmuster auf eine Interaktion mit einem heterozyklischen Histidinring hinweisen. Diese Interaktion mit Histidin war nur in der Wurzel ableitbar. Streuungsmuster der *extended X-ray absorption fine structure* (EXAFS) Analyse im Xylemsaft ergab eine Koordination mit O-Molekülen, ähnlicher der von ZnSO<sub>4</sub> in wässriger Lösung und im Blattmaterial zeigte sich ein Muster aus dem eine Interaktion von Zn mit Citrat abgeleitet wurde.

Zn hat eine Atommasse von 65 u und einen Radius von 135 pm. Damit ist es deutlich kleiner als ein Cd-Atom. Es verfügt aber über, für Pflanzen ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften. Der Unterschied im Atomradius führt, bei einer Verdrängung von Zn durch Cd, zu Konformationsänderungen. Vermutlich bewirkt der größere Atomradius von Cd eine längere Cd-N und Cd-S Bindungslänge was die Konformation des Proteins verändert [26]. Zn findet als Strukturgeber zum Beispiel in Zn-Finger-Proteinen Verwendung. Dies ist von besonderer Relevanz, da dieses Motiv in Transkriptionsfaktoren zu finden ist, welche nahe der DNA operieren. Da Zn nicht redoxaktiv ist [27], induziert es keine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese Eigenschaft ist für ein Element, welches in der Nähe der DNA vorkommt relevant, da ROS-Bildung in DNA-Nähe zur Instabilität eines Genoms führen könnte. Zn eignet sich deshalb als Strukturgeber in Transkriptionsfaktoren.

Neben der Funktion als Strukturgeber hat Zn aber auch eine katalytische Funktion in Enzymen. Das erste 1940 charakterisierte Metalloenzym war die Carboanhydrase II (CA3II, EC4.2.1.1) [27]. Danach wurden noch mehr als 300 weitere Enzyme entdeckt, welche Zn als

Kofaktor erfordern. Darunter finden sich Vertreter aller 6 Enzymklassen. Dies unterstreicht die diverse Nutzung von Zn. Besonders häufig vertreten sind Zn enthaltende Enzyme unter Hydrolasen (18 %) und Lyasen (7 %) [27, 28]. Aufgrund seines vollständig gefüllten d-Orbitals ( $d^{10}$ ) und des sich daraus ergebenden kleinen Atomradius zu Ladungsquotienten wirkt Zink als Lewis Säure [29] als Elektronenakzeptor. Damit ist es der ideale Kofaktor für eine Reaktion die eine redoxstabile Umgebung und einen Lewis-Säure-Katalyst benötigt wie zum Beispiel die Proteolyse oder die Hydratation von Kohlenstoffdioxid [27].

Diese Beispiele heben die Relevanz von Zink für die Funktion einer pflanzlichen Zelle hervor. Es ist, nach Eisen, das zweithäufigste Übergangsmetall in Organismen [29]. Im Boden sind im Mittel  $50\text{--}66\text{ }\mu\text{g/g}_{\text{Boden}}$  Zink enthalten, wobei landwirtschaftlich genutzte Flächen eine größere Variabilität von  $10\text{--}300\text{ }\mu\text{g/g}_{\text{Boden}}$  aufweisen [29]. Durch anthropogene Aktivitäten wird Zink, ebenso wie Blei und Cadmium, in die Umwelt freigesetzt und kann dadurch wesentlich höhere Konzentrationen erreichen. In Bodenproben von sieben kontaminierten Standorten aus Europa konnten 1997 absolute Konzentrationen von  $210\text{--}3259\text{ }\mu\text{g/g}_{\text{Boden}}$  gemessen werden. Die Kontamination stammte von Abgasen nahe liegender Zinkverhüttungsanlagen sowie aus Abwässern [22]. In solch hohen Konzentrationen wirkt das Spurenelement toxisch auf die ansässigen Pflanzen. In diesem Fall treten Wachstumsreduktionen, durch einhergehende Fe-Defizienz induzierte Chlorosen und Veränderungen im Haushalt von Makronährstoffen wie P und Mg auf [29].

Wesentlich häufiger kommt es zu Zinkmangelversorgungen. Ca. 30 % der weltweit landwirtschaftlich genutzten Flächen führen aufgrund von geringen Zn-Verfügbarkeiten zur pflanzlichen Zn-Defizienz [30, 31]. Zu frühen Symptomen in Pflanzen zählt eine Reduktion des Sprosswachstums, gefolgt von einer Reduktion der Proteinsynthese. In stark zinkdefizienten Pflanzen kommt es zu Nekrosen der Wurzelspitzen (Apex), zu intervenialen Chlorosen, einer rot-bräunlichen Verfärbung und der Ausbildung von Symptomen welche der Auxin-Defizienz ähneln, nämlich Epinastie, Verkleinerung der Blattflächen, dem Einrollen der Blattscheide und des verringerten Wachstums der Internodien [29, 30]. Eine Unterversorgung beruht meist auf Bodeneigenschaften, welche die Verfügbarkeit von Zn stark reduzieren. In alkalischen Böden beispielsweise ist die Zn-Aufnahme durch den hohen pH-Wert und die damit verbundene Zn-Unlöslichkeit reduziert. Auch durch eine Sättigung des Bodens mit Wasser verringert sich die Zn-Konzentration der Bodenlösung [31, 32]. Da der traditionelle Anbau von Reis eben diese Bedingungen erfordert, ist die Zn-

Unterversorgung von Reis die häufigste Mangelversorgung mit Mikronährstoffen, die in diesem Grundnahrungsmittel auftritt [33]. Neben der Wachstumsreduktion und den damit verbundenen Ernteeinbußen bei Nutzpflanzen, ist auch der Zinkgehalt in zinkdefizienten Pflanzen reduziert. Das zieht wiederum eine Zinkmangelernährung der Menschen nach sich (Abb. 1).

### **3. Mangan (Mn)**

Mangan ist ein Nebengruppenelement der Gruppe 7 und mit der deutlich kleineren Atommasse von 55 u auch eher mit dem Element Eisen verwandt als Zink und Cd. Im Boden kommt es in Konzentrationen von 60 – 500 mg/kg vor [34, 35]. Mn zeigt ebenso wie Zn aufgrund seiner Klassifikation als mittleres Metall keine Affinität für einen bestimmten Liganden [24]. Es kommt in verschiedenen Oxidationsstufen vor, da seine äußerste Elektronenschale mit nur 5 Elektronen besetzt ist (d5). Mn (+2, +3, +4, +7) sind üblich, wobei die biologisch relevanten Oxidationszustände sich auf +2 und +3 beschränken. Für die Photosynthese von Pflanzen und Algen ist genau diese Eigenschaft, verschiedene Oxidationszustände einnehmen zu können, von Bedeutung. Mehrere Mn-Ionen sind Teil des Photosystems II, in welchem sie durch die eingefangene Lichtenergie oxidiert werden. Beim anschließenden Übergang des Enzyms vom oxidierten in den reduzierten Zustand, wird H<sub>2</sub>O oxidiert und Sauerstoff frei [36]. Außer für diesen, für Organismen der autotrophen Lebensweise wachstumslimitierenden Schritt, wird Mn noch in anderen Reaktionen als Co-Faktor benötigt. So operiert die Mn-abhängige Superoxid-Dismutase (MnSOD) mit Mn im aktiven Zentrum und konvertiert Superoxidradikale ( $\text{'O}_2^-$ ) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches wiederum von Katalasen in Wasser und Sauerstoff umgewandelt wird [37]. Demnach ist Mn an einem, für photosynthetisch aktive Organismen, sehr wichtigen Detoxifikationsmechanismus beteiligt. Da Pflanzen Sauerstoff sowohl selbst produzieren, als auch in der mitochondrialen Respiration verbrauchen müssen, gehen sie gleich mehrmals die Gefahr ein bei einer Reaktion eine gefährliche Sauerstoffspezies zu produzieren. So werden Superoxidradikale durch spontanen Elektronentransfer im lichtangeregten Chloroplasten erzeugt. Die dafür notwendige Energie von 22 kcal/mol kann durch Aufnahme von Lichtenergie leicht



aufgebracht werden [38]. Mn wird somit nicht nur für die Photosynthese benötigt, sondern auch um die Zelle vor schädlichen Nebenprodukten dieser zu schützen.

Andererseits kann Mn selbst, wenn es bei einem Überangebot die Transport- und Lagerungskapazitäten der Zelle übersteigt, zur verstärkten Bildung von ROS führen [39]. Daneben hat ein Überangebot von Mn verschiedenste Symptome wie Nekrosen der Sprossachse oder zerknittert wirkende Blätter zur Folge. Mangan interferiert dabei mit dem Hormonhaushalt, inhibiert DNA Replikation und führt zu vermehrten Fehlern bei der Replikation mitochondrialer DNA [40].

Mn-Toxizität tritt häufiger auf sauren Böden auf, da hier die Verfügbarkeit von Mn höher ist als in Böden welche (bei gleicher Gesamtmenge an Mn) einen neutralen oder alkalischen pH aufweisen. Unter diesen Bedingungen wirken verschiedene abiotische Stressoren auf die Pflanzen. Neben dem Überschuss an Protonen, der die Wurzel schädigen kann [41], kommt es vor allem zu einer Al-Toxizität, ebenfalls ausgelöst durch eine bessere Verfügbarkeit von Al im sauren Boden. Dazu kommt eine Phosphatunterversorgung, da Phosphate bei geringerem pH schlechter verfügbar sind. Die simultane Wirkung dieser 4 Faktoren auf das Wachstum der Pflanzen wird als „*acid soil syndrome*“ zusammenfasst [40, 42, 43].

#### **4. Blei (Pb)**

Neben Cd wirkt auch Blei (Pb) in sub-mikromolaren Konzentrationen toxisch auf die Pflanze [u. a. 41, 42]. Blei ist Element der IV Hauptgruppe, mit einer molekularen Masse von 207.2 u und einem Atomradius von 180 pm. Gelöst liegt es als 2fach positiv geladenes Kation vor. Pb wird den weichen Metallen zugeordnet und geht, ebenso wie Cd, präferenziell Bindungen mit S-Gruppen ein [24].

Aufgrund seiner geringen Härte (1.5 Mohshärte) war es das erste von Menschen bearbeitete Metall und begleitete bereits vor 3000 v. Chr. die menschliche Entwicklung. Dabei wuchs die Produktion exponentiell ebenso wie die begleitend auftretende Verschmutzung der Umwelt mit Blei oder bleihaltigen Produkten [46, 47]. Obwohl seit den 70er Jahren Umweltschutzgesetze die Emission von Blei etwas eingeschränkt haben, bleibt das bereits in die Umwelt eingetragene Blei durch seine extreme Immobilität in den obersten Bodenschichten erhalten und damit für die Pflanzen erreichbar. Diese Immobilität ist

begründet in der Adsorption an organische Bodenpartikel und an Fe-, Al- und Mn-Oxide. Zudem führt die extrem geringe Löslichkeit von Blei bei einem pH über 5 zur Immobilität [45, 48]. In nicht kontaminierten Böden werden Konzentrationen von 20 mg/kg<sub>Böden</sub> erreicht, in kontaminierten mehrere tausend [49, 50]. In Bodenlösungen werden Bleikonzentrationen im sub-nanomolaren bis nanomolaren Bereich (in nicht kontaminierten Böden) bzw. von 1-2 µM (in kontaminierten Böden) gemessen [51]. Die Konzentration in der Bodenlösung wird dabei nicht nur von der Gesamtmenge an Pb im Boden, sondern maßgeblich auch vom pH-Wert beeinflusst. Ein geringer pH-Wert korreliert mit einer hohen Verfügbarkeit von Pb [45, 52–54].

Die Untersuchung der Wirkung von Pb auf Pflanzen gestaltete sich bisher problematisch. Grund dafür ist die schlechte Löslichkeit von Pb. Bei einem pH von 5.7, bei welchem standardgemäß die Anzucht von Pflanzen stattfindet, fällt Blei als Kristall aus. Bei einer Phosphatkonzentration von 100 bis 600 µM, wie sie in üblicherweise verwendeten Wachstumsmedien zu finden ist, wird das Ausfallen von Bleiphosphat weiter begünstigt [45]. Diese Arbeit beschäftigte sich deshalb zunächst mit der Entwicklung eines standardmäßig einsetzbaren Wachstumssystems zur Erfassung der Pb-Toleranz, um anschließend erstmals die Relevanz von Phytochelatinen für die Detoxifikation von Pb nachzuweisen.

### ***5. Bestandteile des Metallhomöostasenetzwerkes***

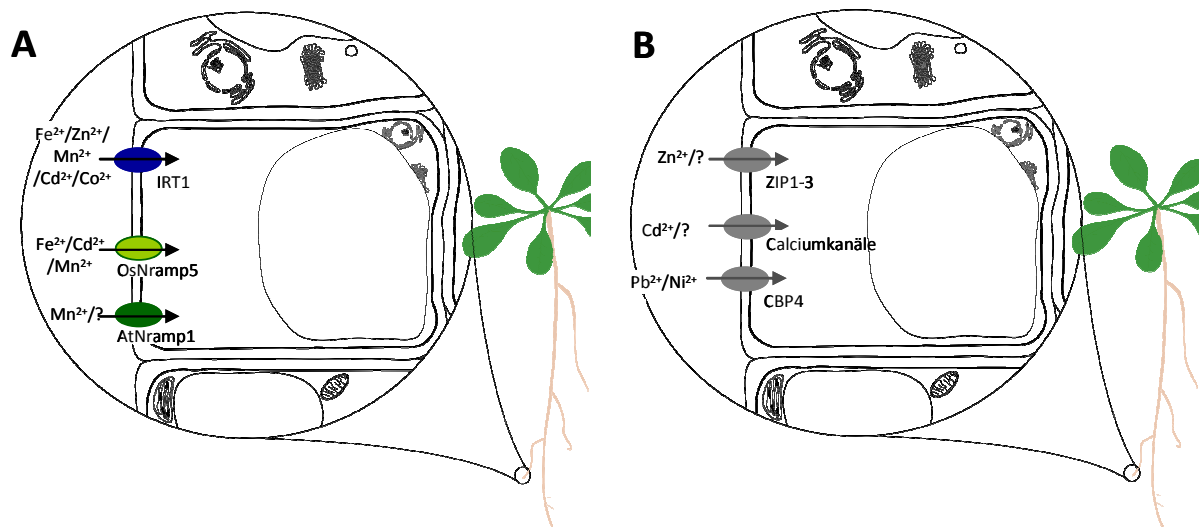
Wie im Vorfeld erläutert, ist es für Pflanzen entscheidend, essenzielle Metalle aus dem Boden aufnehmen und diese über den Spross in alle oberirdischen Pflanzenorgane transportieren zu können. Dabei müssen sie jedoch von den toxischen Schwermetallen unterschieden werden. Diese sollten entweder von der Aufnahme ausgeschlossen werden oder anschließend komplexiert und in dieser inaktiven Form sequestriert werden. Für diese Prozesse sind eine Reihe von Transportern, Transkriptionsfaktoren, Chelatoren und Enzymen zuständig. Man bezeichnet diese und deren Zusammenspiel als Metallhomöostasenetzwerk. Ein vollständiges Bild der bisher charakterisierten Metallhomöostasefaktoren soll hier nicht dargestellt werden. In vielen Fällen existieren nur Hinweise auf eine Transportaktivität. Substratspezifitäten sind oftmals nicht ausreichend untersucht, ebenso wie gewebespezifische Unterschiede in der Regulation oder der Aktivität. Im Hinblick auf die in

dieser Arbeit untersuchten Prozesse werden stattdessen Transporter, die in Wildtyp Pflanzen wichtig für die Toleranz gegenüber Schwermetallen sind besonders hervorgehoben.

### 5.1. Aufnahme aus der Rhizosphäre

Die Wurzel ist für die Pflanze das Organ, über welches der Hauptanteil der Schwermetalle aufgenommen wird. Proteine, die in diesem Kontext den Metalltransport vermitteln, sind somit nicht unmittelbar toleranzrelevant, es sei denn sie sind hypofunktional. Dieser Abschnitt soll demnach nur einen kurzen Überblick über den Eintritt von Schwermetallen in die Pflanze liefern, nachdem dieser Prozess die Voraussetzung für eine spätere Notwendigkeit für Toleranz- und Detoxifikationsmechanismen darstellt (Abb. 2).

Der am besten untersuchte Metallaufnahmetransporter ist *iron-regulated transporter 1* (IRT1). Er wurde als erstes Mitglied der wichtigen Transporterfamilie, der *ZRT-, IRT-like Proteins* (ZIPs), charakterisiert. Die Bildung von IRT1 wird durch Fe-Defizienz induziert, das Protein ist in der Wurzel lokalisiert [55]. Obwohl IRT1 ursprünglich als Fe-Transporter identifiziert wurde [55], zeigte sich durch Hefe-Komplementationsstudien und die Analyse der Transportaktivität, dass auch  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  transportiert werden [56]. Des Weiteren gibt es starke Indizien dafür, dass Cd und Co von IRT1 transportiert werden können. Da für das nicht-essentielle Metall Cadmium keine spezifischen Aufnahmemechanismen existieren, geht man davon aus, dass die Ionen vermittelt durch Transportproteine für Eisen (Fe), Kalzium (Ca), Mangan (Mn) und Zink (Zn) [57] in die Wurzel transportiert werden. Für IRT1 ist die Inhibition des Fe und Zn-Transportes durch Cd dafür ein Hinweis [56]. Des Weiteren zeigen Pflanzen unter Fe-Mangel einen erhöhten Gehalt an IRT1 und damit einhergehend einen erhöhten Gehalt an Cd und Zn in den Wurzeln [56, 58, 59]. Dadurch wird erklärt, warum Cd-Toxizität ein häufiges Problem von Böden mit geringer Fe-Verfügbarkeit ist. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte nachgewiesen werden, dass IRT1 maßgeblich für den Eisentransport *in vivo* verantwortlich ist. Eine *IRT1 knock-out* Mutation erwies sich als letal, sofern die Pflanzen nicht zusätzlich mit  $\text{Fe}^{2+}$  gedüngt wurden. Für diese Mutante wurde zudem eine geringere Cd-Aufnahme unter Eisenmangelbedingungen nachgewiesen [60]. Im Zuge dessen wurde *in vivo* die subzelluläre Lokalisation von IRT1 zur Plasmamembran gezeigt.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Aufnahme von Schwermetallen aus der Rhizosphäre. **(A)** Transporter für deren Funktion in der Metallaufnahme direkte Nachweise erbracht werden konnten. **(B)** Transporter die in der Metallaufnahme impliziert sind.

Transporter der Familie der *Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins* (Nramp), welche zunächst in Säugern im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr beschrieben wurden [61], weisen ebenfalls eine breite Substratspezifität auf. Sie transportieren neben essentiellen Metallen wie Mn, auch nicht-essentielle Metalle wie Cd. Dies konnte zum Beispiel für den Hefe Nramp Transporter SMF1 gezeigt werden [57, 62]. *AtNramp* exprimierende Hefen zeigten außerdem ein stark eingeschränktes Wachstum unter Cd-Stress, was auf den Import von Cd in die Hefezellen zurück zu führen war und in *A. thaliana* konnte durch Überexpression von *AtNramp* eine Cd-Hypersensitivität erzeugt werden [63]. Die eigentliche Funktion von *AtNramp1*, 3 und 4 liegt in der Eisen- und Manganhomöostase. Hinweise dafür gaben Komplementationsstudien mit Hefen, defizient in dem Mangan-Zink Transporter SMF1 [63, 64], wobei erneut auch ein Cd Transport für die Nramps nachgewiesen wurde. *AtNramp1* ist für die Mn-Aufnahme relevant, besonders unter Mn-Mangel. Zudem könnten auch  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  *in vivo* mit geringer Affinität transportiert werden [65]. Für einen weiteren Transporter der Familie, *OsNramp5* konnte ein Transport von  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  nachgewiesen werden. Eine Reduktion der Expression führte zu verringerten Mn-Gehalten in Wurzel und Spross, was für eine Rolle in der Mn-Aufnahme spricht [66–69]. Für Nramp2-Homologe (DCT1/ DMT1 in Säugern) konnte ein Transport von  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der Transporter für deren Aufnahme relevant [70].

Für andere Mitglieder der ZIP Transporterfamilie ist die Beweislage für eine Beteiligung an der Cd-Aufnahme noch unsicher. Der Zn-Transport durch AtZIP1-3 wurde in *S. cerevisiae* partielle durch Cd und Mn blockiert [71]. Die Metalle konkurrieren vermutlich miteinander und werden alle von den Transportern als Substrat akzeptiert. ZIP1 und ZIP3 sind wurzellokalisiert und die Expression ihrer Gene wird durch Zn-Mangel induziert, was für eine Rolle in der Zn-Akquisition aus dem Boden spricht [72].

Eine weitere Proteinfamilie welche vermutlich von Cd für den Import gekapert wurde, sind die Kalziumkanäle. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet kamen aus der Analyse tierischer Gewebekulturen, wie zum Beispiel von Hinkle *et al.* 1987 [73]. Hier konnte gezeigt werden, dass Ca-Kanalinhibitoren eine Verringerung der Cd-Aufnahme zur Folge hatten. Für *A. thaliana* wurde 2002 von Perfus-Barbeoch gezeigt, dass Cd-Stress zum Schließen der Stomata führt, was auf eine Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zurückzuführen war [74]. Ein direkter Zusammenhang zwischen einem spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und Cd-Transport in die Wurzel konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

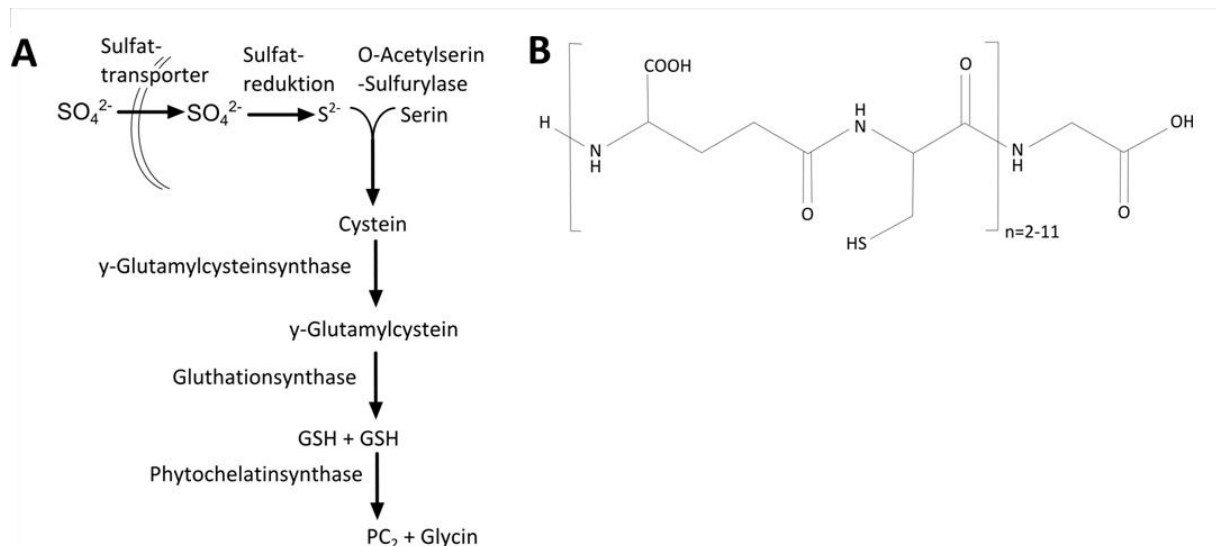
Die  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  Antiporter calcium exchanger 1 (CAX1) und CAX2 wurden ebenfalls mit der Aufnahme von Cd in die Wurzel in Zusammenhang gebracht [75]. In CAX2 überexprimierenden Tabak Pflanzen konnten erhöhte Wurzel-Cd-Gehalte festgestellt werden. Damit scheint CAX2 trotz seiner Lokalisation in dem vakuolären Tonoplast einen Einfluss auf die Cd-Aufnahme zu haben [76].

Für Blei gilt ebenso wie für Cd, dass es vermutlich über Transporter aufgenommen wird, welche für die Akquisition essenzieller Metalle evolvierten. Für ein Calmodulin Binding Protein (CBP) aus *N. tabacum* wurde über einen möglichen Bleitransport spekuliert. Transgene Tabak Pflanzen, welche das *NtCBP4* überexprimieren zeigten eine erhöhte Pb-Intoleranz und eine verstärkte Aufnahme von Pb, während sie gleichzeitig Ni-toleranter waren [77]. Dies deutet zunächst auf einen Ni/Pb spezifischen Prozess hin. Direkte genetische oder biochemische Hinweise auf eine Transportfunktion für Pb gibt es jedoch nicht.

## 5.2. Chelatierung in der Wurzel

Nach ihrer Aufnahme in die Zelle erfolgt eine Komplexierung von Metallen durch metallbindende Proteine bzw. Peptide.

An erster Stelle sind dabei die Phytochelatine (PCs) zu nennen. Dies sind Gluthation (GSH) Derivate, welche durch das Enzym Phytochelatinsynthase (PCS) erzeugt werden. Ein PC Molekül setzt sich dabei aus 2 bis 11 Wiederholungen von  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ -EC) Untereinheiten zusammen, welche jeweils aus einem Glutamat (Glu) und einem Cystein (Cys) bestehen. Am N-Terminus des Peptides ist ein Glycin (Gly) angehängt (Abb. 3 B) [78]. Der erste Nachweis von PCs in Pflanzen erfolgte 1985 durch Grill *et al.* [79]. Dabei wurde, durch die Inkubation von Zellkulturen dikotyler Pflanzen mit Schwermetallen, die Bildung eines bis dato in Pflanzen unbekannten metallbindenden Peptides induziert. Die Struktur dieser Peptide (vgl. Abb. 1) wurde aufgeklärt und sie wurden vom Autor weiterführend als Phytochelatine bezeichnet. 90 % des im Versuch verwendeten Cadmiums waren an diese PCs gebunden, was sie zum wichtigsten metallbindenden Molekül höherer Pflanzen machte.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Bildung von PCs **(A)** Schema der Sulfataufnahme und konsequenter PC-Bildung nach Sulfatreduktion und Assimilation in Cystein, aus welchem Gluthation (GSH) synthetisiert wird. Zwei Moleküle GSH werden von dem Enzym Phytochelatinsynthase (PCS) in ein Molekül PC<sub>2</sub> und ein Glycin umgesetzt. Aus PC<sub>2</sub> und einem weiteren Molekül GSH kann die  $\gamma$ -EC Untereinheit verlängert werden und PC<sub>3</sub> wird gebildet. **(B)** Struktur der Phytochelatine mit  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  adaptiert von Clemens *et al.* 2006 [78].

Im Folgenden wurde die Relevanz von Phytochelatinen unterstrichen, nachdem aufgeklärt werden konnte, dass eine Mutation im Gen *AtPCS1* zu einer Reduktion der PC Synthase Aktivität führt, was eine starke Cd-Hypersensitivität für die Pflanzen zur Folge hatte [80–82]. In *Arabidopsis* sind zwei Gene für die Produktion von PCS verantwortlich, wobei das Gen *AtPCS1* (AT5G44070) einen deutlich größeren Beitrag zur PCS Produktion leistet, wie aus der Analyse der *AtPCS1* und *AtPCS2* Mutanten hervorging ([83]). Die Expression beider Gene ist konstitutiv aktiv. Die Bildung von PCs, wird allerdings durch die Präsenz von Metallionen wie

Cd, Pb, Zn und Ag induziert [84]. Dabei ist Cd der deutlich stärkste Aktivator der PCS [84]. Bei der Analyse *AtPCS1*-defizienter *A. thaliana*-Linien konnte schließlich auch ein Einfluss der Phytochelatine auf die Toleranz nachgewiesen werden. Bei fehlender oder verminderter PCS Aktivität verringert sich die Toleranz gegenüber erhöhten Mengen von Zink, Cadmium und Blei [80, 82, 83]. Für die Bildung von PCs ist die Sulfatassimilation von großer Bedeutung, da die  $\gamma$ -EC Untereinheiten von PCs jeweils zur Hälfte aus Schwefel enthaltenden Cysteinen aufgebaut sind. Sulfat wird mit Hilfe von Sulfattransportern aufgenommen die sich in ihren kinetischen Eigenschaften, in ihrer Regulation und Lokalisation unterscheiden. In den Wurzeln erfolgt die Aufnahme hauptsächlich über Sultr1;1 und Sultr1;2 [85]. Sultr4;1 und Sultr4;2 sind dagegen Sulfatexporter des Tonoplast und remobilisieren hier Sulfate aus der Wurzelvakuole. Im Anschluss an die Aufnahme wird Sulfat als Vorbereitung für die Assimilation aktiviert. Dafür synthetisiert die ATP-Sulfurylase Adenosin-Phosphosulfat (APS), aus welchem, mittels zweier APS-Reduktasen Sulfit ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) hergestellt wird. In einer zweiten Reduktion entsteht, katalysiert durch die Sulfitreduktase, Sulfid ( $\text{S}^{2-}$ ). Sulfid wird durch die O-Acetylserin-Sulfurylase in O-Acetylserin inkorporiert, wodurch Cystein produziert wird. O-Acetylserin wurde dafür durch Acetyltransferasen aus Serin erstellt. Cystein wird durch  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthase (GSH1) zu  $\gamma$ -Glutamylcystein umgebaut, aus welchem die Glutathionsynthase Glutathion (GSH) produziert [85]. Auf diesem Weg ist die Schwefelassimilation entscheidend für die PC Bildung und damit für die Detoxifikation von Schwermetallen durch PCs.

Ein weiteres Peptid, welches Metalle binden und dadurch detoxifizieren und transportfähig machen kann, ist das Metallothionein (MT). MT's sind kleine, cysteinreiche Peptide, die ursprünglich in Nieren, in Zusammenhang mit großen Mengen von Cadmium entdeckt wurden [86]. Metallothioneine waren damit die ersten Moleküle für welche eine Funktion im zellulären Metallmetabolismus beschrieben wurde [87]. Dabei sind MTs, anders als Phytochelatine, Genprodukte und können durch Metalle in ihrer Transkription unterschiedlich verändert werden. Cd induziert zum Beispiel die Expression, vermittelt durch Hitze-Schock-Transkriptionsfaktoren [86, 88]. Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, dass MTs *in planta* Cd binden. Es gibt jedoch ausreichend Hinweise aus heterologen Systemen die darauf hindeuten, dass auch pflanzliche MT Gene Relevanz für die Cd-Detoxifikation haben könnten [89].

Auch organische Säuren wie Malat, Oxalat oder Citrat können Schwermetalle binden. Für Zn ist dabei möglicherweise die Assoziation mit Citrat Toleranz relevant [90, 72]. Ein direkter Zusammenhang zwischen einer Anreicherung an organischen Säuren und der Metalltoleranz konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Neben den oben angesprochenen Chelatoren binden auch Metallochaperone Metalle und befördern sie zu den für sie vorhergesehen Zielproteinen. Anders als Chelatoren ist den Metallochaperonen damit keine Funktion in der Schwermetalltoleranz zugeschrieben. Die Metallochaperone wurden zunächst für Kupfer (Cu) beschrieben und sind für Hefen vor allem unter Cu-Mangelbedingungen relevant, unter welchen sie ihre Bindungspartner vor ungewollten Reaktionen schützen und damit sicher zu den Zielproteinen transportieren [91]. Inwiefern Metallochaperone eine Rolle für die Bindung von nicht-essentiellen Metallen wie Cd spielen, bleibt zu analysieren.

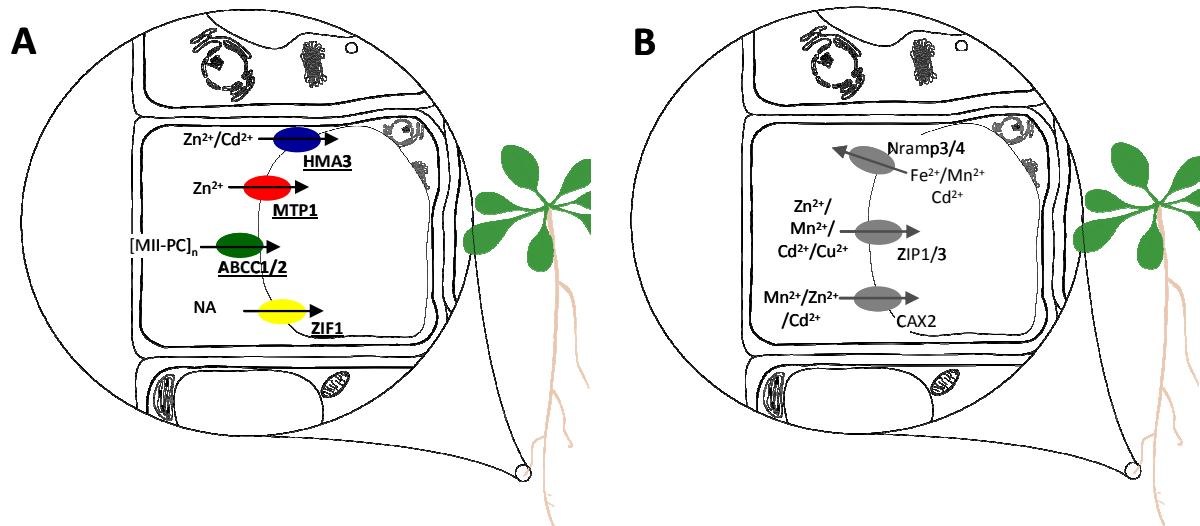
### 5.3. Sequestrierung von Cd in die Wurzelvakuole

Für einige Transporter lässt sich bereits aus der Lokalisation eine Funktion für die Metalltoleranz ableiten. Ein Import von Metallen in die Vakuole führt häufig zur Toleranz gegenüber erhöhten Metallkonzentrationen, da diese in der Vakuole detoxifiziert werden können (Abb. 4).

Ein sehr gut charakterisierter tonoplastidärer Cd-Transporter ist HMA3. Dabei handelt es sich um eine P<sub>1B</sub>-Adenosintriphosphatase (ATPase), die 2001 in *A. thaliana* charakterisiert wurde [92], und zur Klasse der Cd/Zn/Co/Pb transportierenden P<sub>1B</sub>-Typ ATPasen zählt [57]. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde bemerkt, dass in dem sequenzierten Genom eine 1 bp Deletion vorliegt, welche zu einer Verkürzung der universell konservierten ATP-Bindestelle führt. Aus diesem Grund wurde ein Adenin inseriert, um ein besseres Genprodukt beschreiben zu können. 2012 wurde diese Deletion sowie weitere Sequenzunterschiede im *HMA3* Gen verschiedener *A. thaliana* Ökotypen genauer analysiert [93]. Chao *et al.* definierten 10 Haplotypen. 5 davon waren funktional, was durch die verminderte Cadmiumkonzentration im Spross nachzuweisen war. *AtHMA3* ist stärker in der Wurzel exprimiert als im Spross, in welchem es vor allem in den Gefäßgeweben exprimiert ist [94]. Das Transportprotein ist in der Vakuolenmembran lokalisiert und importiert hier Zn und Cd in die Vakuole [10, 95, 94].



Überexpression einer funktionalen Version führt zu vermehrter Cd-Einlagerung in der Wurzelvakuole und damit zu einer verminderten Translokation von Cd in den Spross, was unter anderem in Reis (*O. sativa*) gezeigt werden konnte [10].



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Metalltransportes über den Tonoplast. **(A)** Gesicherte Erkenntnisse über die Transportaktivität existieren nur in wenigen Fällen. Zumeist sind nur **(B)** Hinweise auf eine entsprechende Transportaktivität vorhanden. Transporter, die für die Metalltoleranz von Wildtyp Pflanzen eine Rolle spielen, sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Für PC-Cd low molecular weight (LMW) Komplexe konnte ein Transport über den Tonoplast durch ABC Transporter nachgewiesen werden. 15 Jahre nach der Entdeckung des entsprechenden Proteins in *Schizosaccharomyces pombe* (HMT1) [88, 96], konnte der entsprechende pflanzliche Transporter identifiziert werden. ABCC1 und ABCC2 sind Proteine der Superfamilie ATP-binding cassette (ABC)1. Dabei handelt es sich um die größte Superfamilie, in der fast alle Mitglieder membranständige Transportproteine mit verschiedenster Substratspezifität sind. Die Mitglieder sind als solche durch eine oder zwei ATP-Bindestellen charakterisiert, welche mindestens 40 % Sequenzhomologien unter den ABC Proteinen aufweisen. Jede dieser Bindestellen, auch nucleotide binding folds (NBFs) genannt, enthält dabei drei Sequenzmotive. Zwei Walker Motive (*Walker A box* und *Walker B box*) rahmen dabei ein ABC Signaturmotiv ein. Dazu kommen zwei bis drei charakteristische Transmembrandomänen, welche aus jeweils 4 bis 6  $\alpha$ -Helices aufgebaut sind. Es werden 13 Subfamilien unterschieden, in welchen jeweils eine charakteristische Anzahl und Anordnung dieser Elemente vorherrscht [97]. ABCC1 und C2 gehören zur Unterfamilie der ABCC oder multidrug resistance-associated proteins (MRPs). Für viele der Proteine dieser Unterfamilie wird eine Rolle in der Schwermetalltoleranz vermutet. So zum

Beispiel für den Hefetransporter ScYCF1, welcher As in Komplex mit Glutathion transportiert. Zudem scheinen viele der ABCC Transporter in der vakuolären Membran lokalisiert zu sein [98]. Aus diesem Grund wurde nach einem pflanzlichen Metall-PC Transporter auch in dieser Unterfamilie gesucht, wodurch 2010 ABCC1 und ABCC2 als As-PC Transporter identifiziert wurden [98]. Später zeigte sich auch ein Toleranzeffekt von ABCC1/2 auf Cd und Hg, und auch für PC-Zn, -Mn und -Cu Komplexe gibt es Hinweise einer Transportaktivität durch ABCC1/2 [99–101].

*Metal tolerance protein 1* (MTP1) wurde als erstes Protein der Familie *cation diffusion facilitator* (CDF) in *A. thaliana* identifiziert [102, 103]. Eine Überexpression des Gens führt zur verbesserten Zn-Toleranz, Verringerungen im Proteingehalt durch RNAi zur Zn-Intoleranz [102, 104]. Die Lokalisation im Tonoplast konnte dabei durch mikroskopische Analysen eines GFP-AtMTP1 Fusionsproteins, die Transport-/Importaktivität in *Xenopus* Oocyten nachgewiesen werden.

ZIF1, ein *major facilitator superfamily* (MFS) Protein, ist ebenfalls im Tonoplast lokalisiert und wurde ursprünglich als Zn-Transporter identifiziert [105]. Verringerung der ZIF1 Expression durch T-DNA Insertionen im Gen führt zu erhöhter Zn- sowie Cd-Sensitivität. Kombination der *zif1* Mutanten mit einer *mtp1* Mutanten (ebenfalls ein vakuolärer Zn-Transporter [104]) verstärkte den Zn-Sensitivitätseffekt jedoch nicht. Neben den Lokalisationsstudien mit GFP-fusioniertem ZIF1 lieferte dies einen Hinweis dafür, dass ZIF1 und MTP1 vakuolären Zn-Transporter in unabhängigen Mechanismen sind. Schließlich zeigte sich ein Transport von *Nicotianamin* (NA) durch ZIF1. Durch eine veränderte Bildung dieses Zn-Bindepartners wird die Lokalisation von Zn in der Pflanze verändert. Eine verstärkte NA-Produktion führt zu einem erhöhten Zn-Transport in die Wurzelvakuole, wodurch die Zn-Defizienzantwort angeschaltet wird und eine erhöhte  $\text{Zn}^{2+}$  Konzentration im Zytosol der Wurzel zur Zn-Hypersensitivität führt [106].

Der Hefe Transporter YCF1, ebenfalls ein ABC Transporter, trägt zur Cd-Toleranz in Hefe durch den Transport von Glutathion-S-Cd Konjugaten in die Vakuole bei. Die *A. thaliana*-Homologen MRP1-MRP4 (*multidrug resistance-associated proteins*) zeigen ebenfalls eine GS-Konjugat Transportaktivität *in vitro*. *In vivo* konnte der Transport von Cd-Komplexen jedoch nicht nachgewiesen werden [72, 107].

Möglicherweise kann auch hydratisiertes Cd über den Tonoplast transportiert werden. Dafür gibt es Hinweise durch die Untersuchung der 11 CAX Proteine in *A. thaliana* [108]. Diese sind

im Tonoplast lokalisiert [109] und transportieren ein eher breites Spektrum an Metallen, wie Ca, Mn und Zn über die vakuoläre Membran. CAX2 ist ein effizienter Cd-Transporter, wie die Überexpression z. B. in Tabak zeigte. Hierbei wurde der Cd-Gehalt der Wurzel erhöht, die Toleranz wurde durch Expression von *AtCAX2* nicht beeinflusst [57].

Für eine spätere Translokation von Schwermetallen ist, neben einer Unterdrückung der Metallspeicherung in der Wurzel, auch eine Remobilisierung von bereits in der Vakuole gelagertem Metall notwendig. Für diesen Prozess sind vermutlich die Nramp Transporter verantwortlich. In *A. thaliana* konnte für *Nramp3* Deletionsmutanten eine erhöhte Cd-Toleranz nachgewiesen werden, Überexpression von *Nramp3* führte dagegen zu schlechterem Wachstum unter Cd-Stress, wodurch zunächst eine Funktion in der Cd- und Fe-Aufnahme gesehen wurde [63]. Zu einem späterem Zeitpunkt wurde deutlich, dass *AtNramp3* in der vakuolären Membran lokalisiert ist. Daraufhin wurde die Hypothese abgeleitet, dass Nramp3 für eine Remobilisierung von Metallen vor allem unter Eisenmangel sorgt. Vermutlich wird ein Export von  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  aus der Vakuole vermittelt [110]. Für das homologe Nramp4 [63] ist eine ähnliche Funktion denkbar.

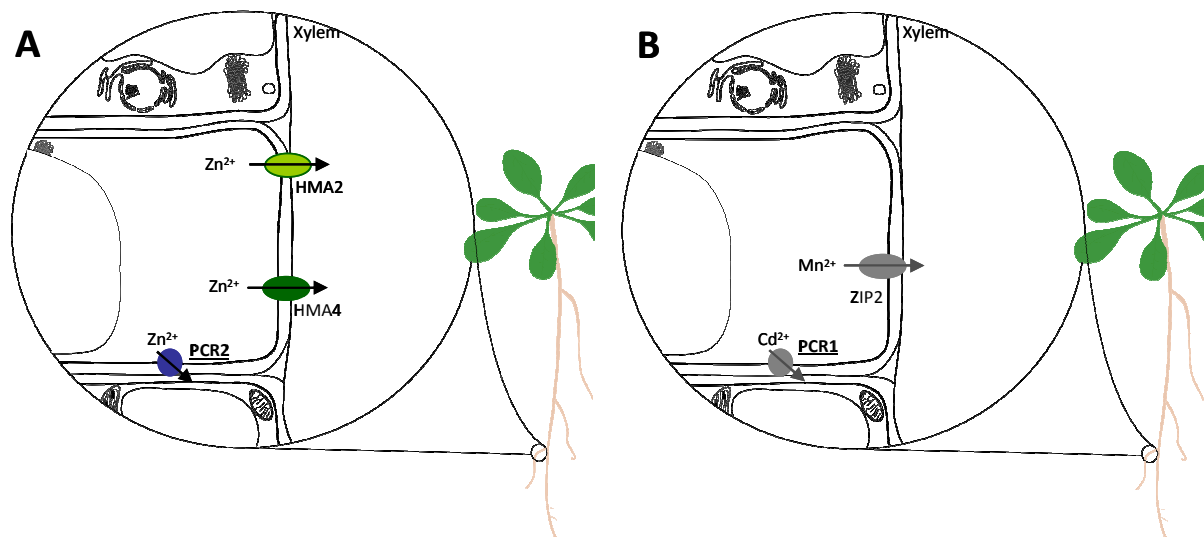
#### 5.4. Translokation in den Spross

Ein toleranzrelevanter Transporter, welcher die Translokation von  $\text{Zn}^{2+}$  in den Spross vermittelt ist *plant cadmium resistance 2* (PCR2). Die größten Sequenzhomologien innerhalb der 12 Transporter dieser Familie finden sich zwischen PCR2 und PCR1, einem Cd-Toleranz vermittelnden Transporter [63, 111]. PCR2 enthält 2 Transmembrandomänen und bildet Homodimere in der Plasmamembran der Wurzelzellen. *pcr2* Mutanten zeigen geringe Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen an Zn, als auch ein schlechteres Wachstum unter Zn-Mangel. Zudem ist eine Wachstumsreduktion unter Cu, Fe und Cd-Behandlung zu sehen, aus der auf eine Funktion in der Cd-Toleranz geschlossen wurde. Aus Metallmessungen in PCR1/2-exprimierenden Hefen wurde abgeleitet, dass es sich bei PCR2 vermutlich um einen Zn-Exporter und bei PCR1 um einen Cd-Exporter handelt [63, 111]. Neben der Charakterisierung von PCR1 und PCR2 als Exporter, gab die Verteilung von Zn in *pcr2* Mutanten Hinweise auf die Funktion in der Zn-Translokation [111].

Für den Transport von Cd in den Spross sind zwei weitere Vertreter der  $P_{1B}$ -Typ ATPasen relevant. HMA2/4 gehören ebenfalls zu den Cd/Zn/Co/Pb transportierenden ATPasen. Sie sind im Leitgewebe exprimiert. Sowohl für Cd als auch für Zn konnte eine Transportfunktion in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Überexpressionslinien akkumulieren höhere Konzentrationen der Metalle in ihrem Spross als der Wildtyp. Eine Doppelmutante, welcher sowohl HMA2 als auch HMA4 fehlen, leidete an Zn-Mangel und zeigte ein reduziertes Sprosswachstum [57].

In Monokotyledonen konnte 1998 ein Transporter (LCT1) identifiziert werden, welcher Cd, Zn und Pb-Transportaktivität aufwies [112]. Für Reis wurde später gezeigt, dass dieser Transporter für die Beladung des Phloems mit Cd und damit für den Cd-Transport in die Samen verantwortlich ist [9, 11]. Eine Reduktion in *OsLCT1* Expression führte dabei zu reduzierten Cd-Konzentrationen im Reiskorn, beeinflusste dabei aber die Konzentration anderer Metalle nicht.

Bisher sind wenig Informationen über transportrelevante Chelatoren bekannt. Für Zn konnte durch SEC-ICP-MS Messungen beispielsweise gezeigt werden, dass es im Xylem von *A. halleri* mit NA zu interagieren scheint [113]. Eine solche Untersuchung des Xylemsaftes und eine Detektion von Metall-Ligand Interaktionen könnte auch für *A. thaliana* Einblick in Chelatoren im Langstreckentransport von Zn, Cd, Mn und Pb geben, ist jedoch in dem Modellorganismus technisch schwierig umzusetzen.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Translokation von Schwermetallen. Gesicherte Erkenntnisse **(A)** existieren nur über wenige Proteine. Für die meisten Transporter sind bisher nur Hinweise **(B)** auf einen Einfluss der Metalltranslokation vorhanden.

### 5.5. Natürliche Variation

Wie ersichtlich, ist das Bild der Metallhomöostase noch längst nicht vollständig und auch für die nicht-essentiellen Metalle ist die Aufnahme und Verteilung wenig verstanden. Ein Aspekt der Metallhomöostase über den bisher besonders wenig in Erfahrung gebracht werden konnte, ist die Erfassung des Metall-Status durch die Pflanze und die darauf folgende transkriptionelle Antwort.

Die Identifikation neuer Komponenten ist aus diesem Grund ein Ziel in der Erforschung der pflanzlichen Schwermetalltoleranz. Neben der Strategie, über genetische *Screens* von mutanten Populationen Gene zu detektieren, welche an der Metallhomöostase beteiligt sind (z.B. Weber *et al.* 2013 [114]), kann auch die Untersuchung von cDNA Bibliotheken (z.B. Song *et al.* 2004 [63]) für die Suche nach solchen Faktoren genutzt werden. Bei diesen *Screens* wird häufig ein Unterschied in der Metalltoleranz für die Identifikation von interessanten Mutationen herangezogen. Da Gene der basalen Metallhomöostase oft auch zur Toleranz beitragen, können durch Metalltoleranz-*Screens* neben Toleranzfaktoren auch Komponenten der Metallhomöostase identifiziert werden. Zum Beispiel führt eine Mutation im Gen *AtPCS1*, welches für eine korrekte Chelatierung und Verteilung der Metalle essenziell ist, zum Verlust von Metalltoleranz [72, 79, 82, 115].

Außer der Analyse und molekularen Charakterisierung von Mutanten, kann auch die innerartliche, natürliche Diversität von *Arabidopsis thaliana* genutzt werden, um Gene der Metallhomöostase zu identifizieren. Voraussetzung dafür ist ein Unterschied zum Beispiel in der Metalltoleranz zweier Ökotypen. Es sind ca. 6000 natürlich vorkommende *Arabidopsis thaliana* Linien (=Accessions) bekannt und über *Seed Centers* erhältlich. Diese wurden über das gesamte Verbreitungsgebiet der Spezies gesammelt und repräsentieren eine enorme genetische Vielfalt. In dem Verbreitungsgebiet, welches sich über den größten Teil Europas bis nach Zentralasien erstreckt und außerdem Japan und die US-West- und Ostküste Nordamerikas beinhaltet, ist die Art verschiedensten abiotischen (und biotischen) Stressoren ausgesetzt. Die Bodeneigenschaften, und damit auch das jeweilige Metallangebot, variieren dabei stark. Zum Beispiel wurden in Europas Oberböden Pb Gehalte von unter 5mg/kg (in Norwegen und Finnland) bis über 40mg/kg (in Teilen Englands) detektiert [116]. Eine Karte, die das Verbreitungsgebiet von *A. thaliana* darstellt findet sich

beispielsweise in der Publikation von Koornneef *et al.* 2004 [117]. Da es sich bei *A. thaliana* um eine selbstbefruchtende Art handelt, kommt sie in natürlichen Systemen in nahezu homozygoten, geografisch voneinander getrennten Populationen vor. Diese unterscheiden sich genotypisch voneinander, weshalb sie auch unter gleichen Wachstumsbedingungen phänotypische Unterschiede zeigen. Eine dieser genetisch distinkten Populationen wird auch als Ökotyp bezeichnet. 1001 dieser Ökotypen werden im 1001 *genomes* Projekt mit dem Ziel sequenziert, die genetische Variabilität von *A. thaliana* zu nutzen, zum Beispiel um Adaptation studieren zu können [118]. Durch das 1001 *genomes* Projekt werden damit immer mehr genotypische Informationen über die Ökotypen zugänglich, was molekulare Analysen erleichtert.

Die Suche nach der genetischen Ursache eines beobachteten phänotypischen Unterschiedes, der Anzahl und Position der für den Phänotyp verantwortlichen Gene, wird als Mapping bezeichnet. Es gibt verschiedene Methoden natürliche Variation für die Detektion von Genen, verantwortlich für einen phänotypischen Unterschied zu nutzen. Eine davon wird als Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping bezeichnet.

Dabei werden Informationen über Genotyp und Phänotyp (in Bezug auf eine spezielle Behandlung, wie zum Beispiel erhöhte Metallkonzentrationen) kombiniert und die Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit der eine genomische Region für die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals verantwortlich ist. Grundlage dafür ist eine Recombinant Inbred Line (RIL) Population, die in der Regel aus mindestens 150-200 *A. thaliana* Linien besteht, von welchen jede auf ein Individuum einer F2 Generation einer Kreuzung zweier *A. thaliana* Ökotypen zurückgeführt werden kann. Während des QTL Mappings können eine oder mehrere genomische Regionen identifiziert werden, in welchen allelische Varianten von Genen eines Elternteils in RILs angereichert sind, die sich und dem entsprechenden Elternteil in ihrem Phänotyp ähnlich sind.

Das erste Beispiel der Detektion eines Gens, welches einer natürlichen Variation zugrunde liegt, erfolgte 1998 von Alonso-Blanco *et al.* [119]. Hier wurde der Blühzeitpunkt in Abhängigkeit von Langtag- oder Kurztagbedingungen und der Vernalisation der Samen erfasst. Identifiziert wurde in einer Cvi-0 X Ler-0 RIL Population der EDI Lokus, welcher in Cvi-0 zu früher Blüte führte. 2001 erfolgte schließlich der Nachweis, dass eine allelische

Variation des bereits 1998 identifizierte Gens *fha1/Cry2*, welches für einen Blaulichtrezeptor codiert, die frühe Blüte in Cvi-0 verursacht [120].

Bis 2004 konnten in mehr als 300 gemappten QTLs 14 Gene identifiziert werden, welche natürliche phänotypische Variationen in *A. thaliana* erklären konnten [117, 121]. Grund für diese geringe Anzahl an molekular aufgeklärter natürlicher Variation ist der komplexe genetische Hintergrund, der bei dem Vergleich zweier Ökotypen bedacht werden muss. Es existieren genetische Unterschiede zwischen fast allen Genen der Ökotypen, was die Detektion des für die phänotypische Variation verantwortlichen Gens erschwert. Entscheidend für die Eingrenzung ist die Verwendung einer möglichst großen Anzahl an RILs, die mit einer hohen Markerdichte charakterisiert wurden. Durch ersteres werden mehr Rekombinationsereignisse selektiert und durch zweiteres wird die allelische Variation der RILs genauer erfasst. Dabei mussten, vor allem vor Zeiten des NGS, Kompromisse aus Kosten, Arbeitsaufwand und Verlässlichkeit der Markeranalyse eingegangen werden. Zum Beispiel ist eine der ersten Populationen in *A. thaliana*, die Cvi-0 X Ler-0 RIL, hauptsächlich durch AFLP Marker charakterisiert [122]. Dieser Typ molekularer Marker erlaubt eine schnelle Unterscheidung von allelischen Varianten im gesamten Genom zweier nahe verwandter Individuen. Er ermöglicht jedoch nicht die Unterscheidung zwischen homo- und heterozygotem Zustand der allelischen Varianten und auch keine basenpaargenaue Lokalisierung [123]. CAPS Marker haben dahin gehend einen Vorteil, sie erfordern jedoch Informationen über die genaue Sequenz der Elternökotypen, welche zum damaligen Zeitpunkt nicht vorlagen.

Ein Beispiel für die Aufklärung einer Metalltoleranz mittels QTL Mapping ist die Identifikation einer Variation in der Sequenz des Transporters HMA5 als Ursache für die nat. Diversität in der Cu-Toleranz von Cvi-0 im Vergleich zu Ler-0. Cvi-0 ist Cu-sensitiver als der Ökotyp Ler-0, was auf einen HMA5 Transporter mit veränderter Aktivität zurückgeführt werden konnte [124]. Dabei wurde die Funktion von HMA5 in der Cu-Translokation bestätigt, die bereits 2006 beschrieben wurde [125]. Eine schnelle molekulare Aufklärung der unterschiedlichen Cu-Toleranzen gelang im Falle dieses QTL Mappings, da für ein Kandidatengen in der QTL Region bereits eine Funktion im Metalltransport beschrieben war.

Ein weiteres Beispiel, bei welchem ein bereits als Metalltransporter identifiziertes Protein in den Zusammenhang mit natürlicher Variation gebracht werden konnte, ist die Untersuchung der Variation des Blatt-Cd-Gehaltes in 349 *A. thaliana* Ökotypen. Dabei wurde 2012 in einer

Genome-Wide Association Study (GWAS) eine genomische Region auf Chromosom 4 identifiziert, welche das Gen *HMA3* enthielt [93]. Die GWAS ist eine weitere Methode, mit der natürliche Variation genetisch aufgeklärt werden kann. Dabei wurde eine Assoziation von single nucleotide polymorphisms (SNPs) mit dem Blatt-Cd-Gehalt detektiert. Von dem SNP mit der signifikantesten Assoziation zum Blatt-Cd-Gehalt lag *HMA3* nur 12 kb entfernt. Wie bereits beschrieben codiert *HMA3* für einen Metalltransporter. Proteine der gleichen Familie wurden zunächst über Sequenzhomologien mit bakteriellen Metalltransportern beschrieben, und 2004 im Bezug auf den Transport unterschiedlicher Metalle charakterisiert [126]. 2009 wurden weitere Hinweise auf die Funktion von *HMA3* im Cd-Transport veröffentlicht [94], weshalb es in der GWAS von 2012 unter den Genen der identifizierten Region ausgewählt und auf seinen Einfluss auf den Cd-Gehalt im Spross von verschiedenen *A. thaliana* Ökotypen hin untersucht wurde. Die natürlich vorkommenden *HMA3* Varianten wurden daraufhin mit der Cd-Translokation in den Spross in Zusammenhang gebracht und es konnte geklärt werden, dass ein nicht-funktionaler *HMA3* Transporter, lokalisiert im Tonoplast der Wurzelzelle, zu erhöhten Blatt-Cd-Gehalten führt. In den 5 Haplotypen mit funktionalem *HMA3* konnten Cd-Ionen in der Wurzelvakuole detoxifiziert und geringere Blatt-Cd-Gehalte erreicht werden. Die 5 verbleibenden Haplotypen zeigten erhöhte Cd-Gehalte im Spross, was auf eine veränderte Transportfunktion von *HMA3* durch Variation der AS-Sequenzen zurückführbar war [93]. Diese Beispiele unterstreichen wie die Analyse der natürlichen, innerartlichen Variation zur Aufklärung einer Genfunktion beitragen kann.

Ein weiteres, selten erreichtes Ziel, der Analyse der natürlichen Variation ist die Aufklärung lokaler Adaptation. Spontane, ungerichtete Mutationen in einer Population können die Besiedlung eines neuen Lebensraumes ermöglichen, wenn durch sie phänotypische Eigenschaften beeinflusst werden, die unter den Bedingungen im neuen Habitat fitnessrelevant sind. In diesem Fall wird die Mutation in der Population nicht nur zufällig erhalten, sondern speziell die Individuen mit dem veränderten/angepasstem Genom überleben im neuen Habitat. Es findet eine Selektion der Mutation statt.

Eine lokale Adaptation konnte beispielsweise für den *HKT1* Locus nachgewiesen werden. 2006 wurden von Rus *et al.* [127] 12 *A. thaliana* Ökotypen auf ihren Spross- $\text{Na}^{2+}$ -Gehalt hin untersucht und ein Unterschied zwischen Col-0 und Tsu-1 wurde detektiert. Dieser konnte genutzt werden, um aus F2 Nachkommen einer Kreuzung der beiden Ökotypen 30



Individuen mit Col-0-ähnlichen  $\text{Na}^{2+}$ -Gehalten zu isolieren sowie 30 Individuen mit hohen  $\text{Na}^{2+}$ -Gehalten, ähnlich denen von Tsu-1. Basierend auf der gDNA dieser 60 Individuen wurden SNPs detektiert, welche mit dem Spross-Salzgehalt assoziierten. Die Position dieser SNPs auf Chromosom 4 bei 6.4 Mb kolokalisierte mit dem *HKT1* Gen, für welches bereits zuvor auf eine Beteiligung am  $\text{Na}^{2+}$ -Transport hingewiesen werden konnte [128]. 2010 wiesen Baxter *et al.* [129] eine Korrelation des Vorkommens der HKT1 Varianten mit reduzierter Aktivität, was zu erhöhten  $\text{Na}^{2+}$  Gehalten im Spross führte, mit der Entfernung von Küsten oder salzreichen Böden nach. HKT1 reimportiert  $\text{Na}^{2+}$  aus dem Xylem in die umgebenden Wurzelzellen und vermindert dadurch den Salztransport in den Spross. Bei einem hypofunktionalen Allel des *HKT1* Gens, wie es häufiger in Ökotypen in Küstennähe oder in der Nähe von salzreichen Böden vorkommt, führte eine verminderte Transportrate (was zur erhöhten Translokation von  $\text{Na}^{2+}$  in den Spross führt) laut Baxter *et al.* zu osmotischen Anpassungen die ihrerseits die Salztoleranz verbesserten. Ein *htk1*-null Allel war dagegen nicht Toleranz fördernd, da die Kapazität der Zelle für vakuoläre Detoxifikation von  $\text{Na}^{2+}$  überschritten wurde.

Da für eine GWAS die Sequenz von Individuen analysiert wird, macht es sie zum idealen Werkzeug lokale Adaptation auch in Spezies zu studieren, für welche genetische Studien die Kreuzungen und die Generation von Inzuchtlinien erfordern, nicht angewandt werden können. Für *Homo sapiens* konnte beispielsweise eine Adaptation an die Höhenlage und die damit verbundene geringe Sauerstoffkonzentration, durch eine genomweite Genotypisierung detektiert werden. In einer tibetanischen Bevölkerungsgruppe wurden dabei konservierte SNP erfasst, die unter den genetisch nahe verwandten, benachbarten Han Chinesen nicht auftreten. Dabei korrelieren die detektierten genetischen Unterschiede zwischen Tibetanern und Han Chinesen mit dem Blut Hämoglobingehalt und stellen vermutlich eine Anpassung an den extremen Lebensraum der Tibetaner dar. Bei den im Flachland beheimateten Han Chinesen waren diese Anpassungen nicht erforderlich [130].

Andere Untersuchungen in *A. thaliana* analysierten eine Adaptation an Trockenheit unter 39 Ökotypen und detektierten eine Verbindung zur Steuerung des Blühzeitpunktes [131]. Ein anderes Beispiel ist die GWAS die unter mehr als 100 Ökotypen eine Anreicherung von SNPs in verschiedenen Subpopulationen detektierte die eine Adaptation an die Temperatur und an die Niederschlagsmenge nahe legten [132].

In der vorliegenden Arbeit sollte die natürliche Variation in der Schwermetalltoleranz von *Arabidopsis thaliana* genutzt werden um, unter Verwendung verschiedener Methoden, neue Metallhomöostasekomponenten zu identifizieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es sich bei der Variation in der Mn-Toleranz die für den Ökotyp Mwg-3 beobachtet wurde, möglicherweise um eine Adaption an den sauren Boden im natürlichen Habitat handeln könnte.

## **Teil 1**

### **Ursachen der höheren Cadmiumtoleranz des *A. thaliana* Ökotyps Bur-0**

## **1. Einleitung**

Werden phänotypische Unterschiede zwischen zwei *A. thaliana* Ökotypen entdeckt, können diese molekular aufgeklärt werden, indem eine *Recombinant Inbred Line* (RIL) Population der beiden Ökotypen etabliert und geno- und phänotypisiert wird.

Die RIL Population wurde aus der zweiten Generation einer Kreuzung der beiden Ökotypen Bur-0 und Col-0 entwickelt, in welchen durch homologe Rekombination ein mosaikartiges Genom, zusammengesetzt aus den beiden Elterngenomen entstanden war [133]. Dabei war dieses Mosaik für jede der Linien, welche aus der Kreuzung entwickelt wurde, ein anderes. Um eine möglichst einfache genetische Situation herzustellen und stabile Linien zu etablieren, wurden die F2 Individuen 6 bis 8 mal geselbstet („*single seed descent*“), wodurch der Anteil an homozygoten Abschnitten in dem zunächst noch weitestgehend heterozygoten Genom der Linien immer größer wurde. Jede der 150 bis 600 RILs wurde anschließend durch molekulare Marker, welche zwischen den beiden Elterngenomen unterscheiden konnten, charakterisiert. Dabei bestimmt die Markerdichte über die spätere Größe der gemappten Intervalle. Je dichter die Marker, desto kleiner das Intervall welches durch das QTL Mapping erzeugt wird. Neben den genotypischen Informationen, wird der Phänotyp jeder RIL in Bezug auf den zu Untersuchenden Faktor benötigt. Die Kombination von genotypischen und phänotypischen Informationen lässt eine Berechnung der wahrscheinlichsten Position der verantwortlichen Gene zu. Ist eine RIL Population einmal etabliert und genotypisiert, kann sie im Hinblick auf verschiedenste Parameter phänotypisiert werden.

RIL Populationen wurden zunächst in der Mausforschung und schließlich auch für die Forschung und Züchtung in Pflanzen verwendet. Früheste Erwähnung einer RIL von *A. thaliana* findet sich in Burr and Burr 1991 [134] und die erste molekulare Aufklärung eines phänotypischen Unterschiedes mit Hilfe einer RIL erfolgte 1994 von Kowalski *et al.* [135]. Die hier zugrunde liegenden RILs wurden erstellt von Simon *et al.* 2008 [133]. Dabei sind die QTL Regionen welche durch diese Methode identifiziert werden können sehr genau. Davon konnten uns Price *et al.* 2006 überzeugen. Hier wurden die ursprünglichen Positionen der QTL Regionen mit den Positionen der Gene verglichen, die abschließend identifiziert werden konnten. Dabei zeigte sich für QTLs mit einem >25 %-igen Anteil am Phänotyp ein Abstand

des Gens von höchstens 1.9 cM vom höchsten LOD Wert, für *minor* QTLs mit einem Phänotyp Anteil von <25 % ein Abstand von weniger als 3 cM [136].

Der Ökotyp Bur-0 aus Irland, wies eine höhere Cd-Toleranz auf als der Ökotyp Col-0 [137]. Diese Cd-Toleranz von Bur-0 sollte unter Zuhilfenahme der Bur-0 x Col-0 RIL Population [133] erforscht werden. Dabei war es das Ziel den molekularen Mechanismus mittels QTL Mapping aufzuklären. Die so identifizierten Kandidatengene sollten durch eine Komplementation von Col-0 durch die Bur-0 Gene bestätigt werden.

Daneben wurde auch die Zn-Toleranz von Bur-0 untersucht und mit der Cd-Toleranz verglichen. Ließe sich eine Korrelation der Phänotypen nachweisen, kämen für die Zn-Toleranz in Bur-0 die gleichen Mechanismen in Frage wie für die Cd-Toleranz.

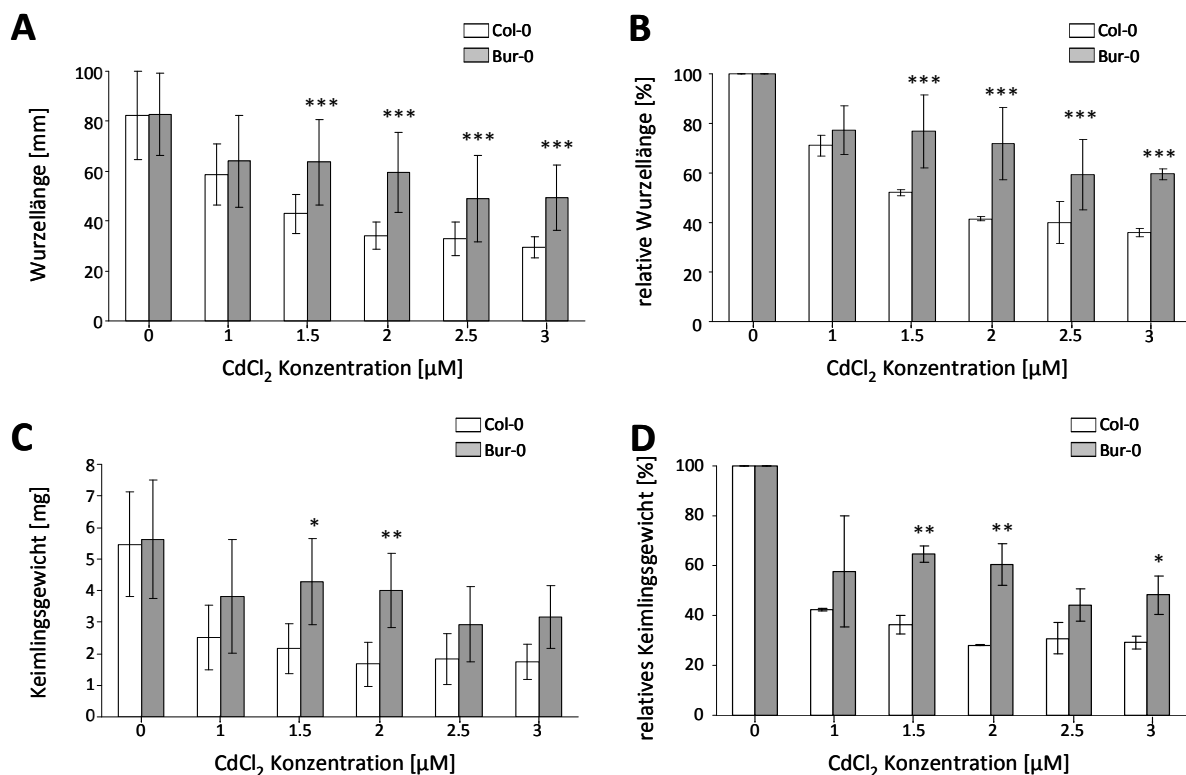
Neben den Unterschieden in der Cd-Detoxifikation sollten auch generelle Wege der Cd-Aufnahme, -Verteilung und -Translokation in *A. thaliana* analysiert werden. Dafür wurde eine Microarrayanalyse von Cd-behandelten Pflanzen durchgeführt. Um natürlich relevante Antworten auf den Stress zu erhalten sollten dabei möglichst geringe Konzentrationen verwendet werden. Die so analysierte Cd-Antwort ermöglicht Aussagen über unter natürlichen Bedingungen relevante Detoxifikationsmechanismen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Vergleich von Bur-0 und Col-0

Die bereits im Habitus sehr unterschiedlichen Ökotypen wurden zunächst vergleichend charakterisiert.

Die Cadmiumtoleranz der beiden wurde erfasst indem das Wurzelwachstum verglichen wurde. Dies erfolgte durch Anzucht der Pflanzen auf Agarplatten welche, neben einem Wachstumsmedium von geringer Ionenstärke (1/10 Hoagland), verschiedene Konzentrationen an  $\text{CdCl}_2$  enthielten.

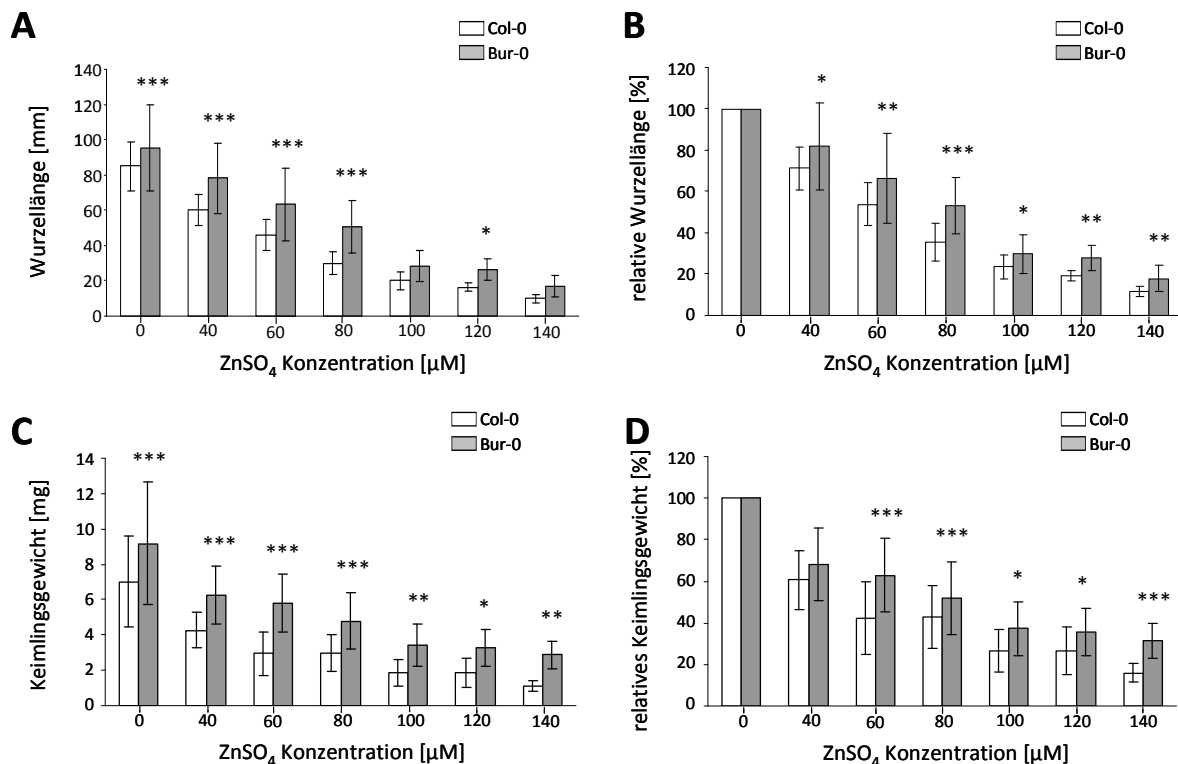


**Abb. 6:** Erfassung des Wachstumsunterschiedes von Bur-0 und Col-0 Keimlingen bei steigendem Cd-Stress. **(A), (C)** Absolute Werte von n: 40-70 Individuen, MW  $\pm$  SD. **(B), (D)** relative Werte aus zwei unabhängigen Versuchen in %. MW  $\pm$  SD, Signifikante Unterschiede zwischen Ökotypen wurde mittels Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , relative Werte wurden dafür *arc sin squareroot* transformiert.

Neben der Wurzellänge wurde auch das Keimlingsgewicht als Maß für die Toleranz der Ökotypen gegenüber Cadmiumchlorid herangezogen. In diesem System war der Ökotyp Bur-

0 Cd toleranter. Bei 2  $\mu\text{M}$  ergab sich, sowohl für das Keimlingsgewicht, als auch die Wurzellänge, der größte Unterschied zwischen Bur-0 und Col-0 (Abb. 6 A, C). Um die Toleranz der Ökotypen vergleichen zu können, wurde das relative Wurzelwachstum /Keimlingsgewicht ermittelt. Dabei handelt es sich um die, gegen das Wachstum unter Kontrollbedingungen normalisierten, prozentualen Werte für beide Parameter. Auch für das rel. Wurzelwachstum sind die größten Unterschiede zwischen den Ökotypen unter 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  Stress erkennbar. Selbiges gilt auch für die rel. Keimlingsgewichte. Bei diesen ist der Unterschied nur unter 1.5 und 2  $\mu\text{M}$  statistisch hoch signifikant.

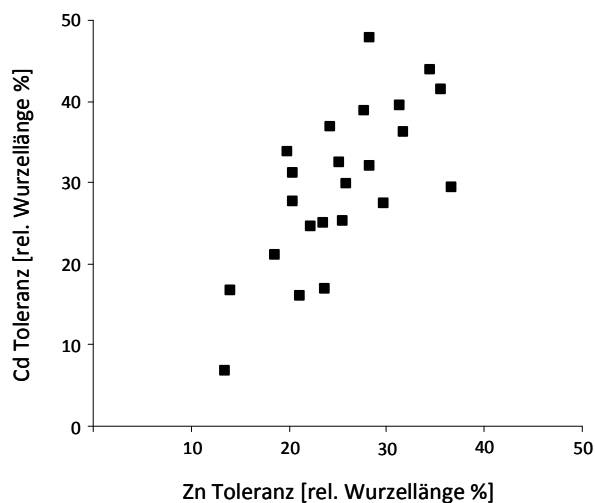
Neben der Cd-Toleranz wurden beide Ökotypen auf ihre Zinktoleranz hin untersucht. Dafür wurden die Keimlinge im gleichen Testsystem steigenden Konzentrationen von Zinksulfat ausgesetzt.



**Abb. 7:** Erfassung des Wachstumsunterschiedes von Bur-0 und Col-0 Keimlingen bei steigendem Zn-Stress. **(A), (C)** Absolute Werte von n: 18-74 Individuen, MW  $\pm$  SD. **(B), (D)** relative Werte aus 2-4 unabhängigen Versuchen in %. MW  $\pm$  SD, Sign. Unterschiede zwischen Ökotypen wurde mittels zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , relative Werte wurden dafür *arc sin squareroot* transformiert.

Auch für dieses Schwermetall zeigte sich eine höhere Toleranz von Bur-0 als von Col-0. Sowohl in absoluten Wurzellängen und Keimlingsgewichten, als auch in Relativen war ein signifikant besseres Wachstum für Bur-0 nachweisbar (Abb. 7). Die Ökotypen zeigten bereits unter Kontrollbedingungen ein signifikant unterschiedliches Wachstum. Bur-0 entwickelte

sowohl längere Wurzelt als auch ein höheres Keimlingsgewicht als Col-0. Aus diesem Grund ist der Vergleich des relativen Wachstums aussagekräftiger, da damit die generellen Wachstumsunterschiede der Ökotypen mit berücksichtigt werden. Bei 80  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  Stress zeigte sich ein hoch signifikanter Wachstumsunterschied sowohl in der Wurzellänge, als auch im Keimlingsgewicht (Abb. 7 B, D). Beide Phänotypen wurden miteinander korreliert (Abb. 8). Dafür wurde die Toleranz von Bur-0, Col-0 sowie von 22 *recombinant inbreed lines* (RILs; siehe Abschnitt 2.2. QTL Mapping des Cadmiumtoleranzphänotyps) bei 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  und 80  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  erfasst. Da jede RIL eine unterschiedliche Kombination aus Bur-0 und Col-0 Allelen trägt, sollte bei einem zugrunde liegenden genetischen Zusammenhang zwischen den beiden Toleranzphänotypen eine hohe Toleranz gegenüber einem Metall mit einer hohen Toleranz gegenüber dem anderen korrelieren. Der mittels statistischer Analyse ermittelte Korrelationskoeffizient von 0.711 beweist den starken Zusammenhang von der Cd- und Zn-Toleranz von Bur-0 und legt nahe, dass die gleichen genetischen Mechanismen für die Toleranzen verantwortlich sind.

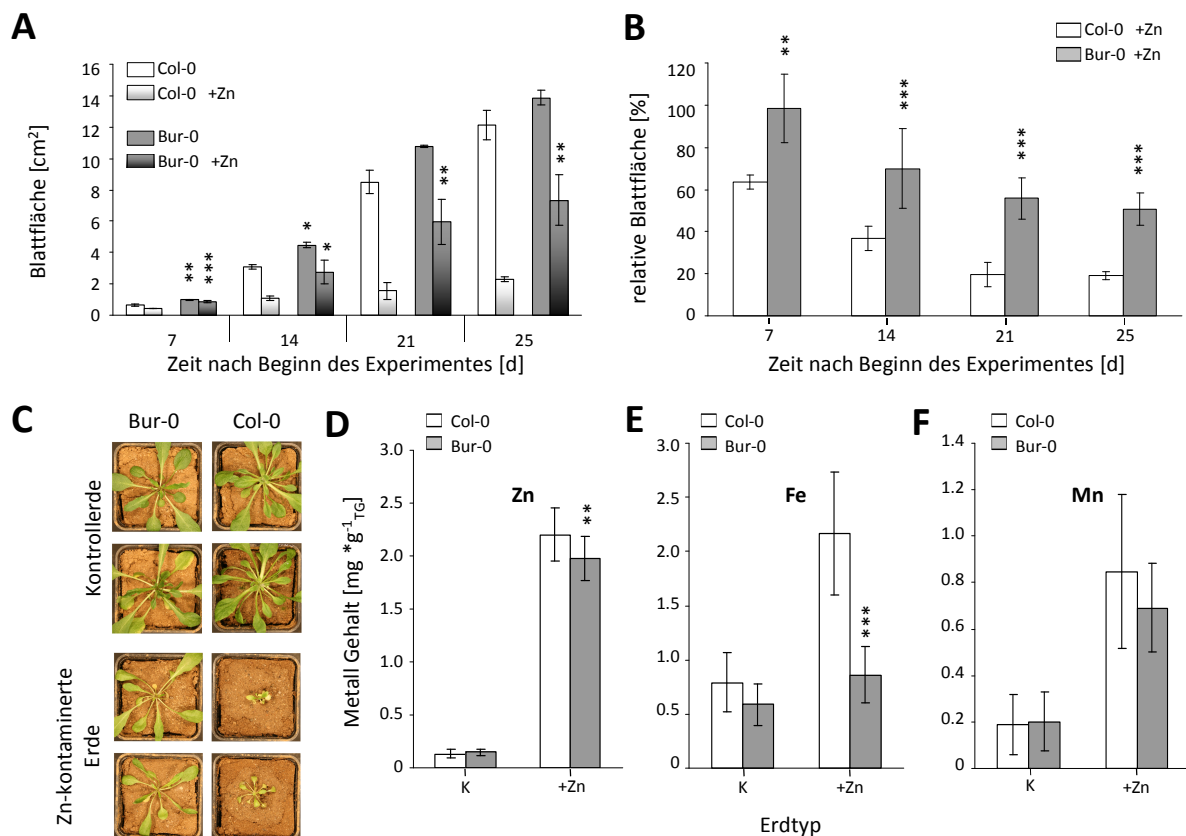


**Abb. 8:** Korrelation der Cd und der Zn Toleranz von Bur-0, Col-0 und 22 Bur-0/Col-0 RILs. Die statistische Analyse der mittleren relativen Wurzellängen von  $n = 4-312$  Individuen, ermittelt unter 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  oder 80  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , wurden mittels *Pearson Product Moment* Korrelation durchgeführt. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.711 ermittelt, welcher mit einem  $p = 0.000142$  hochsignifikant war.

Bei den bisherigen Toleranzanalysen wurden Bur-0 und Col-0 auf artifiziellem Hoagland Medium untersucht. Um den Unterschied im Wachstum in einem natürlicheren System zu untersuchen, wurden Versuche auf Zn-kontaminierter Erde durchgeführt. Dabei wurde die Entwicklung der Blattfläche von 10-12 Individuen jedes Ökotyps über 25 Tage hinweg verfolgt und der Unterschied zum Wachstum unter Kontrollbedingungen dokumentiert (Abb.



9 A, B). Auch in diesem, naturnäheren System lässt sich die höhere Toleranz von Bur-0 gegenüber Zn nachweisen. Bereits nach 7 Tagen ist ein signifikant stärkeres Wachstum von Bur-0, im Vergleich zu Col-0, zu verzeichnen (Abb. 9 A). Da zu den frühen Zeitpunkten auch unter Kontrollbedingungen ein Unterschied in der Blattfläche nachweisbar war, wurde zudem die relative Blattfläche nach 7, 15, 21 und 25 Tagen ermittelt (Abb. 9 B).



**Abb. 9:** Wachstum und Metallgehalte der *A. thaliana* Ökotypen Bur-0 und Col-0 auf Zn-kontaminierter Erde. **(A)** Dargestellt ist die Entwicklung der Blattfläche von Pflanzen welche über einen Zeitraum von 25 Tagen auf Zn-kontaminierter, bzw. auf Kontrollerde angezogen wurden. MW  $\pm$  SD, 2 unabhängige Experimente mit n = 22-24. **(B)** Dargestellt sind relative Blattflächen bei Anzucht auf Zn-kontaminierter Erde im Verhältnis zur Kontrollerde aus drei unabhängigen Experimenten. MW  $\pm$  SD, n = 32-35. **(C)** Beispiele von Pflanzen der beiden Ökotypen nach 25 Tagen Wachstum auf Kontrollerde oder Zn-kontaminierter Erde. **(D-F)** Die mittleren Zn, Fe und Mn-Gehalte im Spross von Bur-0 und Col-0, von Kontroll- oder Zn-kontaminierten Böden, aus drei unabhängigen Experimenten sind angegeben. MW  $\pm$  SD, n = 9. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 wurden mittels Zweiwege-Varianzanalyse mit Tukey Test erhoben. \*: p<0.05 \*\* : p<0.01 \*\*\*: p<0.001

Für alle 4 Zeitpunkte war die rel. Blattfläche von Bur-0 signifikant größer als die von Col-0. Zum späten Zeitpunkt, nach 25 Tagen Wachstum, wurde ein 30%-iger Unterschied ermittelt (Abb. 9 B, C). Neben der Blattfläche wurden außerdem Unterschiede im Metallprofil analysiert. Es zeigte sich, dass Bur-0 beim Wachstum auf Zn-kontaminierter mineralischer Erde signifikant weniger Zn und Fe im Spross enthält als Col-0 (Abb. 9 D, E). Das es sich dabei nicht um einen generellen Effekt handelt, bei welchem Bur-0 unter Zn-Stress weniger

Metalle in den Spross transportiert, zeigt sich am Mn-Gehalt. Hier unterscheiden sich die beiden Ökotypen nicht. In Tab. 1 sind die im Versuch verwendeten Erden charakterisiert. Die Kontrollerde unterscheidet sich von der mit Zn-kontaminierten Erden nur im Zn-Gehalt. Unterschiede im Wachstum zwischen Pflanzen auf Kontrollerde und auf Zn-kontaminierter Erde sind damit nur auf den erhöhten Zn-Stress zurück zu führen.

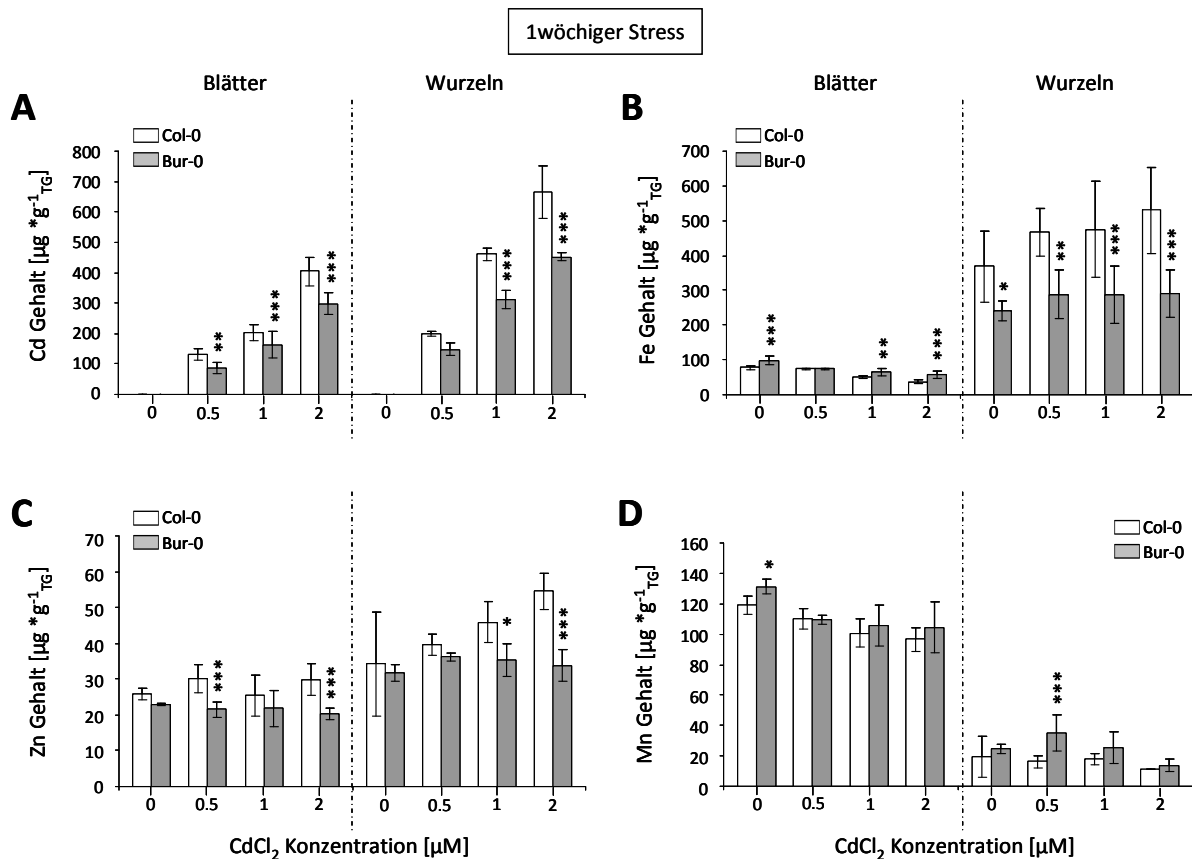
**Tab. 1:** Charakterisierung der für die Erdexperimente verwendeten Erde. Metallgehalte in  $\mu\text{g/g}_{\text{Tg}}$  wurden mittels ICP vor (Roherde), sowie nach dem Bewuchs mit Pflanzen bestimmt. Gelistet sind MW  $\pm$  SD der drei unabhängigen Experimente.

	K			+ Zn		
	Roherde	Bur-0	Col-0	Roherde	Bur-0	Col-0
Zn	52.1	45.5 $\pm$ 4.2	44.6 $\pm$ 2.4	755.9	743.6 $\pm$ 64.0	738.5 $\pm$ 63.2
Fe	167.8	159.2 $\pm$ 25.3	155.4 $\pm$ 28.7	233.6	174.2 $\pm$ 15.6	173.6 $\pm$ 13.9
Mn	141.7	118.4 $\pm$ 12.5	117.1 $\pm$ 12.5	155.9	148.7 $\pm$ 12.7	147.7 $\pm$ 13.5
Al	266.7	264.2 $\pm$ 26.7	264.5 $\pm$ 23.2	294.2	280.2 $\pm$ 31.2	279.0 $\pm$ 28.1

Neben der Toleranz wurden Metallprofile von Bur-0 und Col-0 unter Cd- und Zn-Stress erfasst. Dafür wurden Pflanzen hydroponisch angezogen und bei einem Alter von 5 Wochen unterschiedlichen Konzentrationen von  $\text{CdCl}_2$  oder  $\text{ZnSO}_4$  ausgesetzt. Die Metallgehalte in Wurzel und Spross wurden zu zwei Zeitpunkten, einmal nach 7 Tagen und einmal nach 3 Wochen, quantifiziert (Abb. 10, 11, 12, 13).

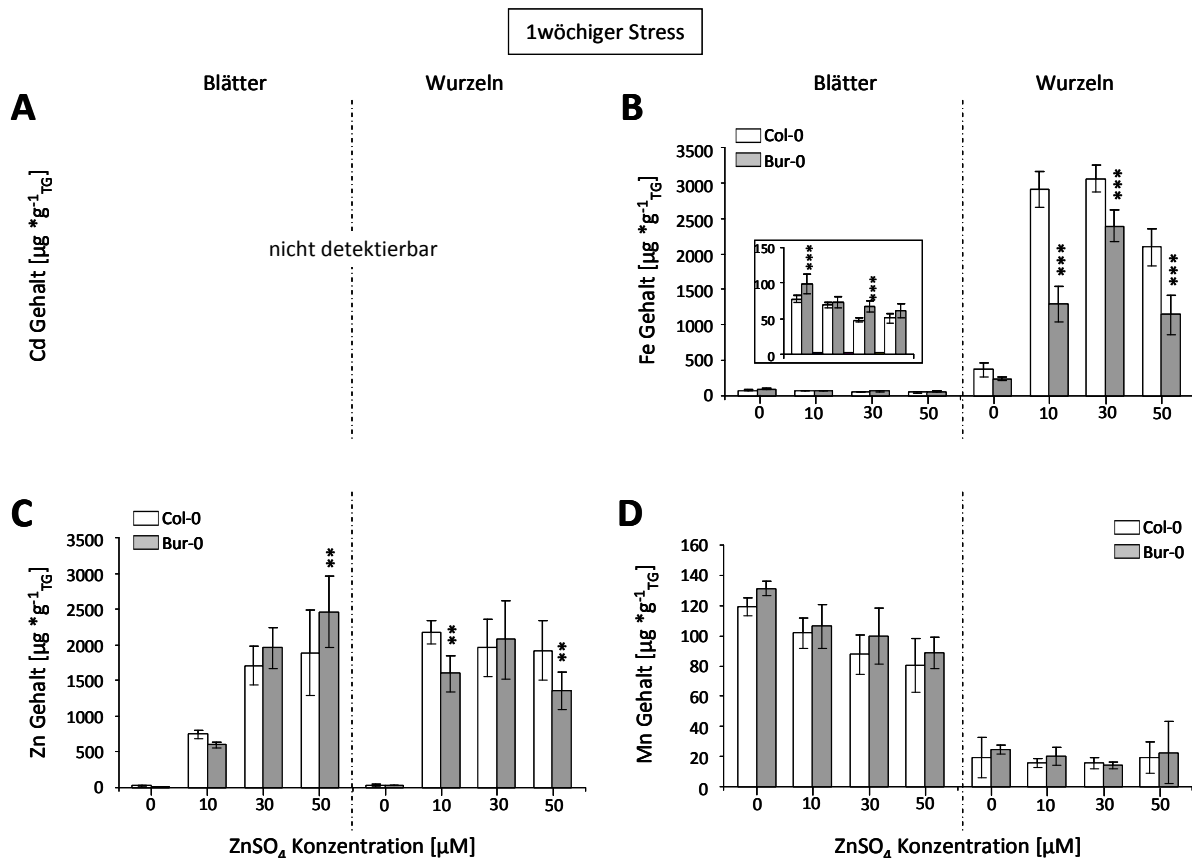
Wurden *A. thaliana* Pflanzen des Ökotyps Bur-0 für 1 Woche mit Cd gestresst, nahmen sie dabei weniger Cadmium aus dem Medium auf als Col-0 Pflanzen (Abb. 10). Dies zeigte sich an signifikant geringeren Cadmiumgehalten in der Wurzel von Bur-0 welche mit mindestens  $1 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  gestresst wurden. Auch im Blatt fanden sich Unterschiede, hier bereits bei einer Konzentration von  $0.5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Abb. 10 A). Der Eisengehalt in den Wurzeln zeigte, wie auch für Cadmium, eine geringere Aufnahme von Eisen in Bur-0 welche durch die Zugabe von Cd kaum beeinflusst wurde. Der Eisengehalt der Wurzel von Col-0 stieg dagegen mit zunehmendem Cd-Stress an. Im Spross der Pflanzen waren nur sehr geringe Unterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 messbar. Es zeigte sich jedoch, dass Bur-0 eine höhere Eisentranslokationsrate besitzt als Col-0, da bereits unter Kontrollbedingungen mehr Eisen im Spross zu finden war als im Spross von Col-0. Dieser Unterschied zeigte sich auch unter Cd-Stress, wobei er einzig bei einer Konzentration von  $0.5 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  im Medium nicht ausgebildet wurde (Abb. 10 B). Der Zinkgehalt folgte keinem klar erkennbaren Trend. Tatsächlich konnte nach Cd-Stress etwas mehr Zink in den Wurzeln von Bur-0 und Col-0 nachgewiesen werden, der Anstieg in Bur-0 ist jedoch minimal. Für Col-0 ließ sich eine

deutliche Zunahme des Zinkgehaltes verfolgen. Nach Wachstum unter 1 und 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  Stress war Dieser signifikant. In Bur-0 waren die Blatt-Zn-Gehalte anders als die Fe-Gehalte ebenfalls geringer als in Col-0, und spiegelten damit den Trend der Wurzelzinkgehalte wieder (Abb. 10 C). Bur-0 akkumulierte also weniger Cd, Fe und auch Zn in Wurzeln, aber nur teilweise auch in den Blättern. Dass es sich dabei nicht um eine generell geringere Metallaufnahme- und Metalltransportrate handelte, zeigte sich am vierten untersuchten Metall. Für Mangan ließ sich kein Einfluss des Genotyps auf die Gehalte in der Wurzel oder im Blatt feststellen. Auch Cadmiumstress beeinflusste die Verteilung nicht signifikant. Die Konzentrationen im Spross waren höher als in der Wurzel, anders als für die drei anderen quantifizierten Metalle. Bur-0 und Col-0 unterschieden sich nur vereinzelt in ihrem Mangangehalt und es wurde keine wirkliche Abhängigkeit sichtbar (Abb. 10 D).



**Abb. 10:** Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 1-wöchiger Behandlung mit zunehmenden  $\text{CdCl}_2$  Konzentrationen. Wurzel- (links) und Blattmaterial (rechts) wurden getrennt analysiert. Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von drei unabhängigen Experimenten, bei welchen jeweils 2 Pools von je 4 Pflanzen analysiert wurden.  $n_{\text{Total}} = 6$ . Signifikante Unterschiede im Metallgehalt der Ökotypen wurde durch Datenanalyse mittels Einwege-Varianzanalyse und Tukey Test ermittelt. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Wurden die Pflanzen mit Zn statt mit Cd behandelt, veränderten sich nicht nur die Gehalte von Cd und Zn in Blatt und Wurzel beider Ökotypen (Abb. 11). Cd, welches keine Komponente des Wachstumsmediums ist, stand nicht mehr zur Aufnahme zur Verfügung und war nicht nachweisbar (Abb. 11 A). Für die Eisenwerte in den Blättern Zn-gestresster Bur-0 und Col-0 Pflanzen konnten keine Unterschiede zu denjenigen unter Cd-Stress detektiert werden. Bur-0 enthielt etwas mehr Eisen in den Blättern, ein Unterschied der jedoch nicht bei allen untersuchten Stressbedingungen signifikant war (Abb. 11 B). Cd und Zn hatten demnach den gleichen Effekt auf den Blatt-Fe-Gehalt, beide führten zu einer signifikanten Reduktion. In der Wurzel war erneut eine geringere Menge an Eisen in Bur-0 nachweisbar. Dabei stieg der Eisengehalt in Abhängigkeit von der Menge an Zn, mit welchem die Pflanzen gestresst wurden, zunächst an. Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  im Medium setzte sich dieser Trend jedoch nicht fort und es war wieder etwas weniger Eisen in der Wurzel nachweisbar (Abb. 11 B). Damit ist auch der Wurzel-Fe-Gehalt durch Zn und Cd ähnlich beeinflusst.



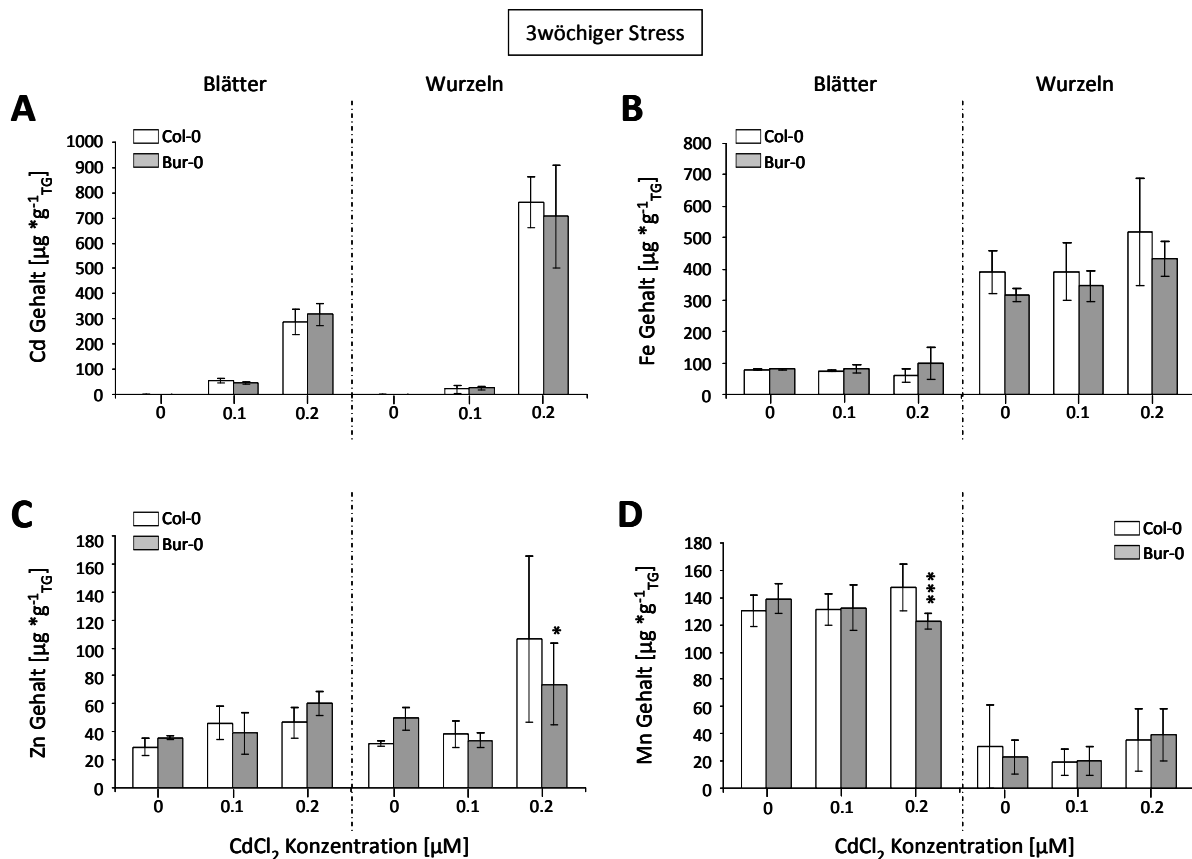
**Abb. 11:** Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 1-wöchiger Behandlung mit zunehmenden  $\text{ZnSO}_4$  Konzentrationen. Wurzel- (links) und Blattmaterial (rechts) wurden getrennt analysiert. Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von drei unabhängigen Experimenten, bei welchen jeweils 2 Pools mit je 4 Pflanzen analysiert wurden.  $n_{\text{Total}} = 6$ . Signifikante Unterschiede im Metallgehalt der Ökotypen wurde durch Datenanalyse mittels Einwege-Varianzanalysen und Tukey Test ermittelt. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Es wurden jedoch sehr viel höhere Eisengehalte von bis zu 3200  $\mu\text{g/g}_{\text{Tg}}$  statt nur 500  $\mu\text{g/g}_{\text{Tg}}$  erreicht (vgl. Abb. 11 B und Abb. 10 B). Die Zn-Gehalte in Blatt und Wurzel waren nach Zn-Stress wesentlich höher als unter Kontrollbedingungen oder nach Cd-Stress wo sie nur zwischen 20 und 50  $\mu\text{g/g}_{\text{Tg}}$  lagen (vgl. mit Abb. 11 C). Ein Genotypeinfluss war dabei nicht immer nachweisbar. In den Blättern nahm der Zn-Gehalt in Abhängigkeit von der Stärke des Zn-Stresses zu. Bei den stärksten Stressbedingungen waren signifikante Unterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 nachweisbar. Hier enthielt Bur-0 mehr Zn als Col-0. In der Wurzel war die umgekehrte Situation zu beobachten. Wurden Pflanzen mit 10 oder 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  gestresst, enthielt Bur-0 signifikant weniger Zn als Col-0. Dabei folgte der Zn-Gehalt in der Wurzel nicht der Stärke des Stresses dem die Pflanzen ausgesetzt waren. Bei allen drei Konzentrationen wurden in etwa die gleichen Zn-Gehalte nachgewiesen (Abb. 11 C). Das sich die Mediencharakteristika durch die Zugabe von entweder Cd oder Zn nicht generell ändern, ließ sich anhand des Mn-Gehaltes schlussfolgern. Dieser unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Behandlungen (vgl. Abb. 10 D und Abb. 11 D).

Für 1 Woche alte Pflanzen war ein Volumen von 50 ml Wachstumsmedium ausreichend für eine gute Versorgung mit Makro- und Mikroelementen. Für ältere Pflanzen welche 3 Wochen gestresst wurden, erfolgte die Behandlung in Pflanztöpfen. In diesen wurden 3 Pflanzen in je 1.5 l Medium angezogen. Auch im zweiten System wurde der Effekt einer Cd und Zn-Behandlung auf die Metallgehalte analysiert (Abb. 12, 13).

Unter Behandlung mit sehr geringen  $\text{CdCl}_2$  Konzentrationen konnte für den Cd-Gehalt keine Genotyp-Abhängigkeit beobachtet werden. In beiden Ökotypen war der Gehalt in Blatt und Wurzel abhängig von der Konzentration im Medium. In der Wurzel wurden höhere Cd-Gehalte gemessen werden (Abb. 12 A). Diese Beobachtung konnte auch schon bei 1-wöchig gestressten Pflanzen gemacht werden. Trotz geringerer Konzentrationen im Medium wurden ähnliche oder sogar höhere Cd-Gehalte erreicht als bei einem 1-wöchigen Stress (vgl. Abb. 10 A und 12 A). Der Eisengehalt der Blätter war sehr gut mit dem Fe-Gehalt von 1-wöchig mit Cd- oder Zn-behandelten Pflanzen vergleichbar. Es wurden keine Genotypeffekte und keine Effekte der Behandlung sichtbar. In den Wurzeln konnte kein signifikant geringerer Fe-Gehalt in Bur-0 nachgewiesen werden, anders als bei den jüngeren Pflanzen. Tendenziell wurden auch hier leicht erhöhte Eisengehalte in den Cd-gestressten Pflanzenwurzeln gemessen (Abb. 12 B, vgl. mit Abb. 10 B). Die Zn-Gehalte in den Blättern zeigten nach 3-wöchigem Cd-Stress leicht erhöhte Werte, ein Trend der nach 1 Woche nicht

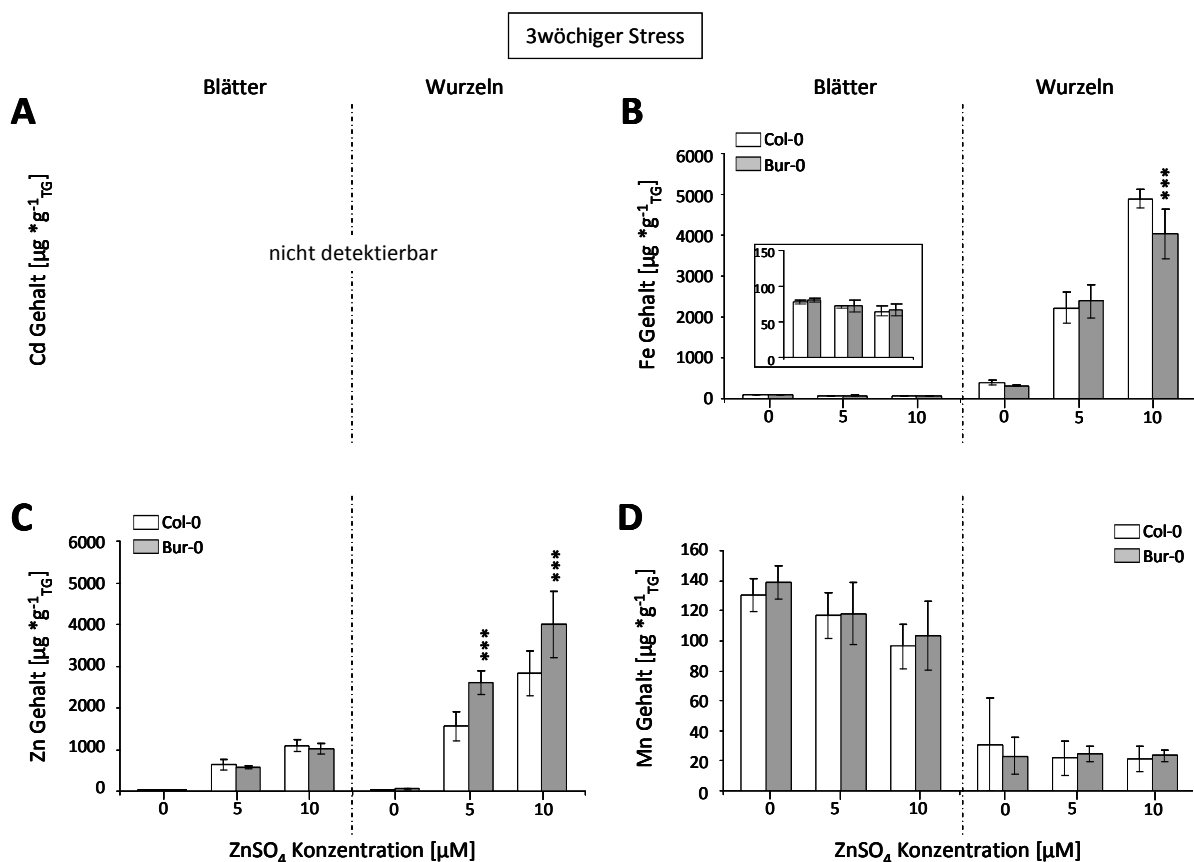
feststellbar war. In den Wurzeln war dies noch deutlicher ausgeprägt. Hier wurden jedoch auch die höchsten Variationen an Metallgehalten festgestellt. Der ermittelte Bur-0 – Col-0 – Unterschied sollte demnach bestätigt werden (Abb. 12 C). Mn-Gehalte in Blatt und Wurzel entsprachen denen vorheriger Messungen. Es war keine Beeinflussung durch den Cd-Stress erkennbar (Abb. 12 D).



**Abb. 12:** Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 3-wöchiger Behandlung mit zunehmenden CdCl<sub>2</sub> Konzentrationen. Wurzel- (links) und Blattmaterial (rechts) wurden getrennt analysiert. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten  $n_{\text{Total}} = 6$ . Signifikante Unterschiede im Metallgehalt der Ökotypen wurde durch Datenanalyse mittels Einwege-Varianzanalysen und Tukey Test ermittelt. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Nach 3-wöchigem Zn-Stress konnte, wie auch schon in 1-wöchig gestressten Pflanzen, wie erwartet kein Cd in den Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 13 A). Erneut war der Eisengehalt der Blätter vergleichbar mit vorherigen Messungen. Der Fe-Gehalt der Wurzeln war vergleichbar mit dem Gehalt in für 1 Woche mit Zn gestressten Pflanzen. Sehr hohe Fe-Werte wurden nach Inkubation in 5 oder 10  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> erreicht. Dabei enthielt Bur-0 signifikant weniger Fe nach 10  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> Stress (Abb. 13 B). Damit setzte sich der Trend der vorherigen Messungen fort (vgl. Abb. 10, 11, 12 und 13 B). Der Zn-Gehalt in Wurzel und Blatt war auch hier abhängig von der Zn-Konzentration im Wachstumsmedium. Je höher die Konzentration, umso mehr war in den Pflanzen nachweisbar. Dabei enthielten Wurzeln mehr

Zn als Blätter. Gehalte in Bur-0 lagen über denen in Col-0, nachdem die Pflanzen mit 5 oder 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  behandelt wurden (Abb. 13 C). Dieser genotypische Effekt auf den Zn-Gehalt zeigte sich auch schon bei 1-wöchig Zn-gestressten Pflanzen. Bei diesen war die Abhängigkeit des Zn-Gehaltes von der Stressintensität jedoch nur in den Blättern sichtbar und nicht, wie bei den älteren Pflanzen, auch in der Wurzel. Zudem wurden, nach 3-wöchigem Stress mit geringen  $\text{ZnSO}_4$  Konzentrationen höhere Zn-Gehalte in der Wurzel erreicht als nach 1-wöchigem Stress (vgl. Abb. 11 C, 13 C). Der Mn-Gehalt war vergleichbar mit vorherigen Messungen. Es war eine leichte Reduktion durch Zn-Behandlung aber kein Genotypeneffekt nachweisbar (Abb. 13 D).



**Abb. 13:** Metallprofile für (A) Cd, (B) Fe, (C) Zn und (D) Mn von Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen sowie nach 3-wöchiger Behandlung mit zunehmenden  $\text{ZnSO}_4$  Konzentrationen. Wurzel- (links) und Blattmaterial (rechts) wurden getrennt analysiert. Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von drei unabhängigen Experimenten  $n_{\text{Total}} = 6$ . Signifikante Unterschiede im Metallgehalt der Ökotypen wurde durch Datenanalyse mittels Einwege-Varianzanalysen und Tukey Test ermittelt. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Generell konnte beobachtet werden, dass Bur-0 unter bestimmten Bedingungen weniger Zn und Cd aufnimmt. Eine Zusammenfassung der Trends in Tab. 2 zeigt, dass höhere Metallgehalte häufiger in Col-0 detektierbar sind (Tab. 2 B, Genotypeneinfluss). Zudem ist auch die Beeinflussung der Cd-, Zn-, Fe-, und Mn-Gehalte durch eine Behandlung mit Cd oder Zn dargestellt (Behandlungseinfluss).

**Tab. 2:** Tendenzielle Effekte der Cd- bzw. Zn-Behandlung auf die Metallgehalte in Col-0 und Bur-0 (Behandlungseinfluss), sowie der tendenzielle Vergleich der Metallgehalte in Bur-0 und Col-0 unter den verschiedenen Stressbedingungen (Genotypeneinfluss). **(A)** 1-wöchiger Zn-Stress, **(B)** 1-wöchiger Cd-Stress, **(C)** 3-wöchiger Zn-Stress, **(D)** 3-wöchiger Cd-Stress; W (Wurzel); B (Blatt); n.e. (nicht eindeutig) Unterschiede nicht konsistent in Wurzel und Blatt bzw. zwischen den unterschiedlichen Metallkonzentrationen; k.U. (keine Unterschiede) keine signifikanten Unterschiede detektierbar; -:Metall nicht detektierbar

1wöchiger Zn-Stress				1wöchiger Cd-Stress			
<b>A</b>	Behandlungseinfluss		Genotypen- einfluss	<b>B</b>	Behandlungseinfluss		Genotypen- einfluss
	Col-0	Bur-0			Col-0	Bur-0	
Zn	↑	↑	n.e.	Zn	↑ (W)	k.U.	Col-0 > Bur-0
Cd	-	-	-	Cd	↑	↑	Col-0 > Bur-0
Fe	↑ (W) ↓ (B)	↑ (W) ↓ (B)	n.e.	Fe	↑ (W) ↓ (B)	↓ (B)	Col-0 > Bur-0
Mn	k.U.	k.U.	k.U.	Mn	↑ (B)	↑	Bur-0 > Col-0

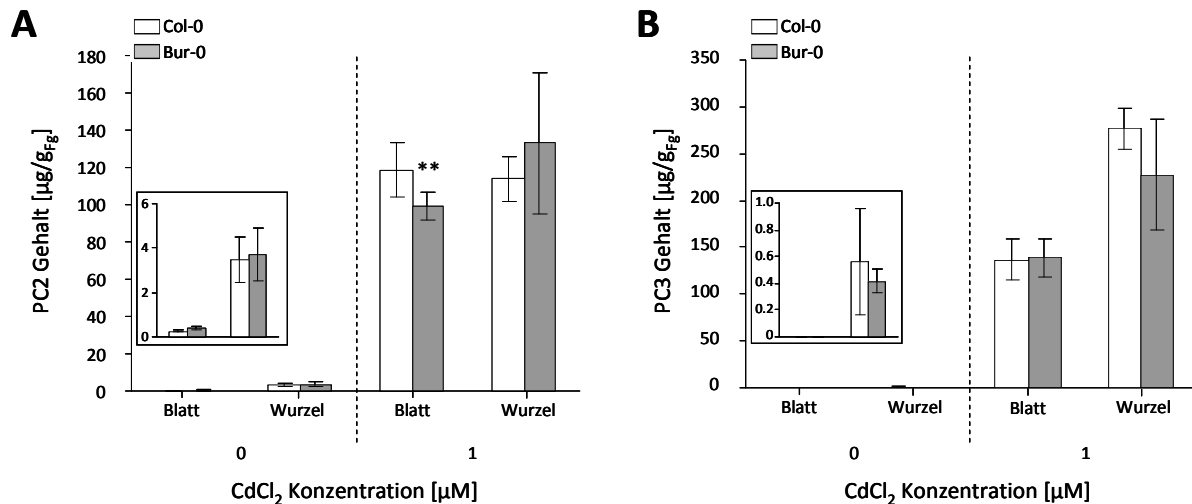
3wöchiger Zn-Stress				3wöchiger Cd-Stress			
<b>C</b>	Behandlungseinfluss		Genotypen- einfluss	<b>D</b>	Behandlungseinfluss		Genotypen- einfluss
	Col-0	Bur-0			Col-0	Bur-0	
Zn	↑	↑	Bur-0 > Col-0 (W)	Zn	↑	↑	k.U.
Cd	-	-	-	Cd	↑	↑	k.U.
Fe	↑ (W) ↓ (B)	↑ (W) ↓ (B)	Col-0 > Bur-0 (W)	Fe	↑ (W)	k.U.	k.U.
Mn	↓ (B)	↓ (B)	k.U.	Mn	k.U.	↓ (B)	k.U.

Die wichtigsten Metabolite für die Cd-Detoxifizierung in *A. thaliana* sind PCs [80, 82]. Aus diesem Grund wurden Phytochelatingehalte von 6 Wochen alten, mit 1 µM CdCl<sub>2</sub>-behandelten Pflanzen erfasst (vgl. Abschnitt: 2.5. Bur-0 vs. Col-0 – der Microarray). Unter diesen Bedingungen sollte eine Induktion der PC-Bildung nachweisbar sein. Sollten Unterschiede im PC-Gehalt zwischen den Ökotypen erfasst werden, könnte dies bereits eine Erklärung für die höhere Cd-Toleranz von Bur-0 sein. Höhere PC-Gehalte in Bur-0 nach Cd-Stress würden auf eine effizientere Detoxifikation hinweisen.

Tatsächlich wurden jedoch nur sehr geringe Unterschiede in der PC Akkumulation entdeckt. Wie erwartet stieg der Gehalt an PC2 und PC3 nach Cd-Behandlung an (Abb. 14). Im Blatt von Bur-0 konnten dann leicht geringere PC2 Gehalte beobachtet werden als in Col-0 (Abb. 14 A). Es waren jedoch weder in der Wurzel, noch im PC3 Gehalt im Blatt Unterschiede feststellbar. Eine erhöhte PC-Produktion in Bur-0 ist demnach nicht die Ursache für die Toleranz des Ökotyps. Gleichzeitig ist dies ein Hinweis auf eine ähnlich starke Aktivierung der PCS in Bur-0 und Col-0, was auf einer ähnlichen zytosolischen Cd-Konzentration beruhen könnte. Die Expressionsvergleiche unter Cd-Behandlung, welche aus den Microarraydaten, basierend auf denselben Pflanzen, abgeleitet wurden, beruhen somit vermutlich nicht auf



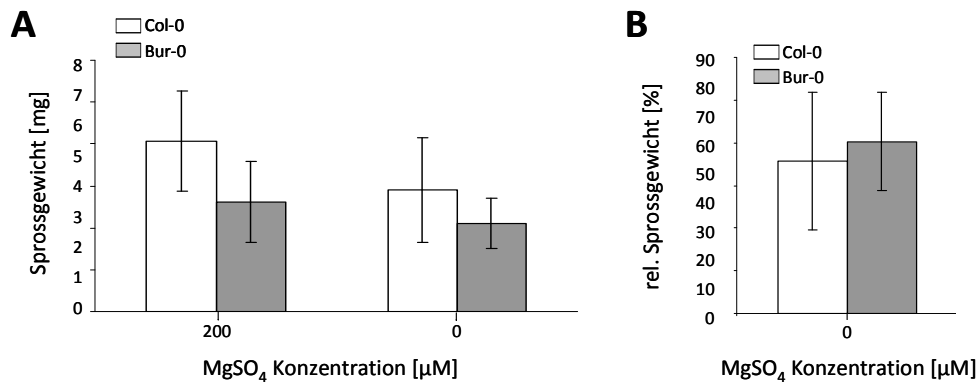
einer unterschiedlichen Cd-Aufnahme. Unterschiede in der Expression repräsentieren demnach die unterschiedlichen physiologischen Reaktionen zweier Ökotypen auf Cd (vgl. 2.5. Bur-0 vs. Col-0 – der Microarray).



**Abb. 14:** Quantifizierung der Phytochelatin Gehalte in Pflanzen des Microarrays. PC2- (**A**) und PC3- (**B**) Gehalte wurde in Blatt und Wurzel der Pflanzen, welche für die Extraktion der RNA für den Microarray verwendet wurden, gemessen. Es wurde zwischen Kontrollen und 1 µM CdCl<sub>2</sub> gestressten Pflanzen unterschieden. Dargestellt sind die MW ± SD der beiden unabhängigen Anzuchten, für welche jeweils zwei Pflanzenpools in je drei technischen Replikaten vermessen wurden. Vier Werte mit mehr als der doppelten SD vom MW wurden nicht in die Analyse mit einbezogen.  $n_{\text{total}} = 3-4$ , Signifikante Unterschiede zwischen Ökotypen wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse und Tukey Test ermittelt. \*\*:  $p < 0.01$

Schwefel ist häufig der limitierende Faktor bei der Produktion von Phytochelatinen (PCs), der Stoffe die hauptsächlich für die Cd-Komplexierung verantwortlich sind [138]. Eine erhöhte Cd-Toleranz kann darum auf einen effizienteren Schwefelhaushalt zurückzuführen sein [85, 139]. Ist der Grund für die bessere Toleranz von Bur-0 in der besseren Aufnahme von Schwefel zu suchen, dann sollte Bur-0 neben einer höheren Cd-Toleranz auch ein besseres Wachstum unter Schwefelmangelbedingungen zeigen als Col-0. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde das Wachstum beider *A. thaliana* Ökotypen auf Medium verglichen, dem kein Magnesiumsulfat zugesetzt wurde (Abb. 15). Die den Pflanzen zur Verfügung stehenden Schwefelquellen sind demnach neben den Einlagerungen von Schwefel im Samen nur die Spuren von Schwefel welche als Verunreinigungen anderer Chemikalien, vor allem des Agars [140], in das Medium eingetragen wurden. Ein schwefeleffizienterer Ökotyp sollte unter solchen Bedingungen ein stärkeres Wachstum zeigen. Dies könnte möglicherweise einen Hinweis auf den Mechanismus der Cd-Toleranz von Bur-0 geben.

Das Sprossgewicht welches als Indikator für ein besseres Wachstum zwischen den Ökotypen verglichen wurde, zeigte keine Unterschiede von Bur-0 und Col-0. Ein effizienterer Schwefelhaushalt ist danach als Ursache für die Cd-Toleranz von Bur-0 noch nicht ausgeschlossen, jedoch weist diese Analyse nicht darauf hin.



**Abb. 15:** Vergleich des Wachstums von Bur-0 und Col-0 unter Schwefelmangel. Dargestellt sind Sprossgewichte **(A)** und relative Sprossgewichte **(B)** als Maß der Effizienz der Schwefelaufnahme. Dargestellt sind MW ± SD. n = 15-19

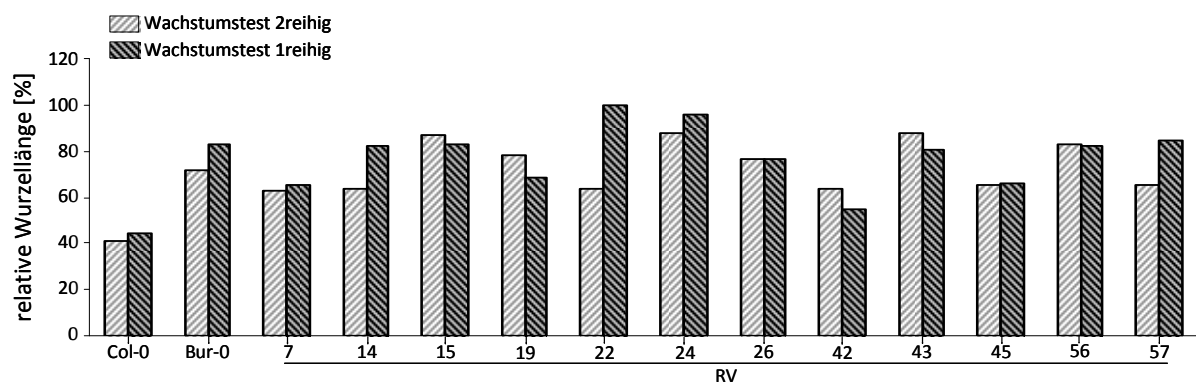
## 2.2. QTL Mapping des Cadmiumtoleranzphänotyps

Zur Aufklärung der dem Toleranzphänotyp zugrunde liegenden, genetischen Unterschiede wurde die Cd-Toleranz der Bur-0 – Col-0 *Recombinant Inbreed Lines* (RILs) [133], mit der Bezeichnung RV, erfasst. Nach der Feststellung der optimalen Stressbedingung (Abb. 16) zur Differenzierung der Bur-0/Col-0 Cadmiumtoleranz, wurden die Pflanzen bei 2 µM CdCl<sub>2</sub> auf Agarplatten angezogen. Als Parameter der Cd-Toleranz wurden dabei die relativen Wurzellängen und die relativen Keimlingsgewichte von 164 RILs erfasst.

In den ersten Versuchen wurden 6 RV Linien mit jeweils 9 Samen in zwei Reihen auf einer Agarplatte getestet. Von 142 Linien konnten die relative Wurzellänge, welche von 23% bis 95.5% variierte, sowie das relative Keimlingsgewicht (36 % bis 103 %) bestimmt werden. 23 RILs wiesen eine schlechte Keimungsrate auf, was die Anzahl an auswertbaren Individuen zu stark verringerte, weshalb sie nicht in die anschließenden Analysen mit dem Programm MapQTL5<sup>®</sup> [141] einbezogen wurden. Die Daten wurden von 6 separaten Versuchen erhoben. Für jeden einzelnen Versuch wurden die Bedingungen durch den Vergleich von Bur-0 und Col-0 bestätigt.

Nach Erstellung der Genotypkarten der einzelnen Chromosomen jeder RIL unter Zuhilfenahme der Daten von Simon *et al.* [133], sowie einer Liste der relativen Wurzellängen und Keimlingsgewichte jeder RIL, wurden diese Informationen mit dem MapQTL5® Programm ausgewertet. Bei der Korrelation der Wurzellängen mit den Genotypen errechnete das Programm für Chromosom 5, Position 1.6 bis 4 Mb, LOD Werte von 2.4 bis 3.3 (vgl. Abb. 18 A). Weiterhin wurden keine signifikanten Korrelationen der Phänotypen mit den Genotypen ermittelt. 12.6% des Bur-0/Col-0 Unterschiedes wurden durch den QTL auf Chromosom 5 erklärt.

Aufgrund der niedrigen LOD Werte wurde der Wachstumsversuch wiederholt. Dafür wurde zunächst in einem Vorversuch die Cadmiumtoleranz von Keimlingen verglichen, welche in 1 bzw. 2 Reihen auf den Agarplatten wuchsen (Abb. 16).



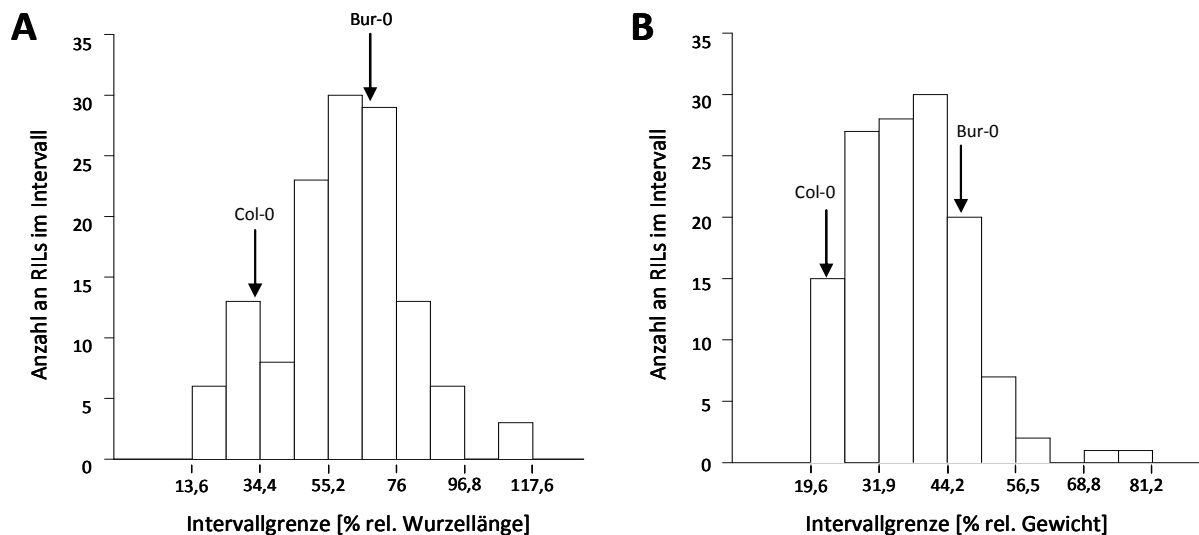
**Abb. 16:** Vergleichende Darstellung des rel. Wurzelwachstums in einer Reihe mit dem in 2 Reihen auf Agarplatten unter  $2 \mu\text{M CdCl}_2$ . Das Wachstum von Col-0 und Bur-0 sowie von 12 RILs wurde erfasst. Die Wurzellänge von 1-reihig angezogenen Keimlingen (dunkel schraffiert) wurden nach 17 Tage ausgewertet, 2-reihig angezogene (hell schraffiert) nach 12 Tagen. MW, n= 18-30.

Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Unterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 deutlicher erfassbar sind, wenn die Pflanzen in nur einer Linie auf den Agarplatten angezogen wurden. Dabei haben einzelne Pflanzen ein größeres Nährstoffangebot was sich auf das Wachstum auswirkt. Ein Vergleich der Cadmiumtoleranz von 12 RILs unter den Anzuchtvarianten 1-reihig und 2-reihig zeigten tendenziell ähnliche rel. Wurzellängen.

Im Folgenden wurde aufgrund der besseren Unterscheidungsmöglichkeit von Bur-0 und Col-0 die Toleranz der RILs in 1-reihigen Wachstumstests erfasst. Des Weiteren wurde die Anzahl an Individuen von 9 auf 6 reduziert. Dadurch konnte die gegenseitige Wachstumsbehinderung der Pflanzen vermindert werden.

Nach der erneuten Erfassung der Toleranz konnten 131 der 164 Linien in die Auswertung mit einbezogen werden. Das Wurzelwachstum variierte von 13.5% bis 117.5%, das

Sprossgewicht von 19.6% bis 81%. Die Daten wurden von 14 separaten Versuchen erhoben, wobei sich Bur-0 und Col-0 im Mittel 22% im Wachstum unterschieden. Das rel. Wurzelwachstum der RV Linien folgte einer Normalverteilung, anders als das rel. Keimlingsgewicht welches geringfügig zu leichteren Pflanzen hin verschoben war (Abb. 17).

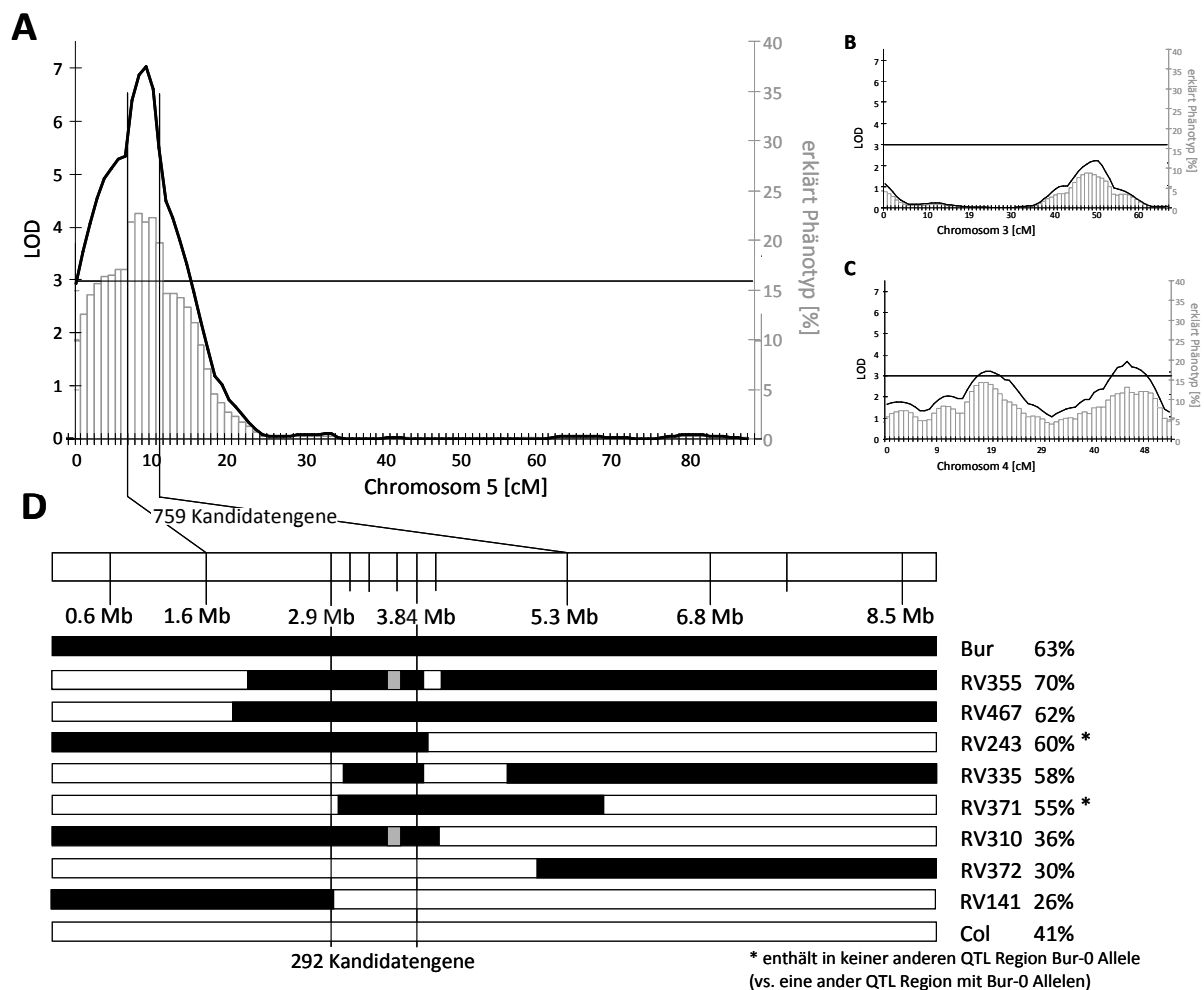


**Abb. 17:** Histogramme zeigen die Verteilung des rel. Wurzelwachstums (**A**) und des rel. Keimlingsgewichtes unter Cd-Stress (**B**) in der RIL Population. Für Bur-0 und Col-0 ist die mittlere rel. Wurzellänge ( $65 \pm 10$  % sowie  $43 \pm 10$  %) und das mittlere rel. Keimlingsgewicht ( $45.7 \pm 10$  % sowie  $22.9 \pm 10$  %) in den Histogrammen angezeigt.

Für die Map-QTL Analyse wurden aus diesem Grund die rel. Wurzellänge verwendet. Mit den neu erfassten Toleranzwerten wurde auf Chromosom 5 ein signifikanter LOD Wert errechnet, welcher bei 9.1 cM ein Maximum von 7.2 erreichte. Für diese Region wurde ermittelt, dass sie zu 20 % an der Ausbildung des Toleranzphänotyps beteiligt war. Der QTL wurde demnach auf die Region 1.6 bis 5.3 Mb auf Chromosom 5 eingegrenzt (Abb. 18 A). Auf den Chromosomen 3 und 4 wurden drei weitere QTLs mit signifikant erhöhten LOD Werten, aber nur geringfügigem Effekt auf den Phänotyp, ermittelt. Auf Chromosom 3 wurde der LOD von 2.1 bei 16.67 Mb berechnet welcher zu 8 % Anteil an dem Phänotyp hat (Abb. 18 B). Auf Chromosom 4 wurden 2 QTLs, mit einem LOD von 3 bei 5.6 bis 6.9 Mb und von 3 bei 14.8 bis 15.7 Mb errechnet. Sie erklären 13 sowie 12.5 % des Phänotyps (Abb. 18 C).

Nur 67 kb von der Region des höchsten LOD Scores auf Chromosom 4 entfernt liegt das Gen *AtHMA3* (At4G30120) für welches bereits gezeigt werden konnte, dass natürlich vorkommende Allele Unterschiede in der Konzentration von Cadmium im Spross erklären können [93]. Beschrieben sind Varianten wie diejenige in Col-0, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Dies ist mit einer erhöhten Spross-

Cadmiumkonzentration verbunden. In Bur-0 wird eine funktionale Variante des *HMA3* Gens exprimiert. Zudem sind in der QTL Region nur 3 Gene unter 243 im Zusammenhang mit Metallhomöostase und -toleranz annotierten (pers. Kommunikation Singh *et al.*). Drei Parameter machen *HMA3* zu einem offensichtlichen Kandidatengen für die Erklärung der höheren Toleranz von Bur-0 gegenüber Cadmium. (I) *HMA3* ist ein bekannter Cd-Transporter, (II) Das *HMA3* Gen liegt nahe am höchsten LOD Wert und (III) zwischen Bur-0 und Col-0 existieren am *HMA3* Locus Sequenzunterschiede, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie zu Unterschieden in der *HMA3* Funktion führen. *HMA3*<sub>Bur-0</sub> wurde aus diesen Gründen für eine Komplementation von Col-0 ausgewählt (Abschnitt 2.6. Das Kandidatengen *HMA3*).



**Abb. 18:** Ergebnis der Korrelation der relativen Wurzellängen mit den Genotypen der RILs auf Chromosom 5 durch das Programm MapQTL5<sup>®</sup>. **(A)** Graphische Darstellung der logarithmischen Wahrscheinlichkeit auf Chromosom 5 das Gen verantwortlich für den quantifizierte Phänotyp zu finden (schwarze Linie, linke Skala) sowie des Anteils des Phänotyps, welcher durch die jeweilige chromosomale Region erklärt wird (graue Balken, rechte Skala). **(B)** Darstellung des LODs und des Anteils an dem Gesamtphänotyp für Chromosom 3 und **(C)** für Chromosom 4. Die horizontale Linie kennzeichnet den Grenzwert über dem die Korrelation von Phänotyp und Genotyp höchst signifikant ist. **(D)** Markeranalysen erlauben die Eingrenzung des relevanten Intervalls von 2.9 bis 5.3 auf 2.9 bis 3.84 und damit von 759 auf 292 Kandidatengene. Schwarz: Genotyp Bur-0, Weiß: Genotyp Col-0, Grau: Genotyp unbekannt.

### 2.3. Eingrenzung des Intervalls auf Chromosom 5

Aufgrund des geringen Beitrages den die anderen QTLs zu der höheren Toleranz von Bur-0 gegenüber Cadmium leisten, wurde im Folgenden versucht das Gen im QTL auf Chromosom 5 zu identifizieren. Nach der Festlegung des QTL Bereiches wurden die Genotypen der RILs in diesem Bereich genauer betrachtet. Es wurden Linien ausgewählt, deren Genotyp im QTL Bereich von Bur-0 zu Col-0 oder anders herum wechselte (Abb. 18 D, Tab. 3).

**Tab. 3:** Genotyp der für die weitere Eingrenzung des QTL Bereiches ausgewählten RILs. Marker wie von Simon *et al.* [133] angegeben. Die physikalische Position auf Chromosom 5 und die Position in cM, wie im Datensatz für das Programm Map-QTL verwendet, sind angegeben, sowie der Genotyp (A: Col-0; B: Bur-0) der jeweiligen Linie an dieser Position. In Gelb unterlegt ist der Bereich der signifikantesten LOD Werte, zusätzlich ist die Position der höchsten Signifikanz markiert. Die relativen Wurzellängen der Linien sind in % angegeben. Bur-0 lag bei 63 %, Col-0 bei 41 %.

Marker	Physik Pos (Mb)	Positon (cM)	RIL Nummer:							
			141	372	310	371	335	243	467	355
*576	0.6	0.0	B	A	B	A	A	B	A	A
*1587	1.6	4.6	B	A	B	A	A	B	A	B
*2900	2.9	6.1	B	A	B	A	A	B	A	B
*4011	4	9.1	A	A	B	B	A	A	B	B
*5319	5.3	11.5	A	B	A	B	B	A	B	A
*6820	6.8	18.9	A	B	A	A	B	A	B	A
*7442	7.4	20.4	A	B	A	A	B	A	B	A
*8563	8.6	25.1	A	B	A	A	B	A	B	A
			26%	30%	36%	55%	58%	60%	62%	70%

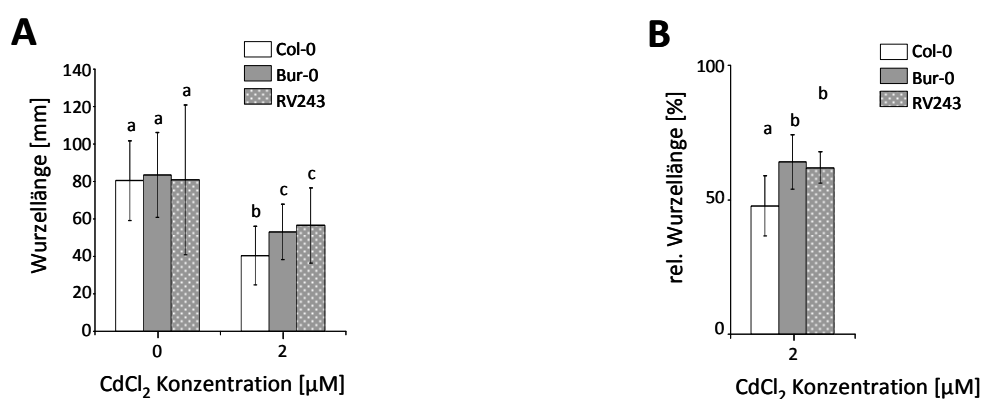
Im Folgenden wurden CAPS Marker erstellt, was eine genauere Auflösung des Genotypenmosaiks dieser RILs im Bereich von 2.9 bis 5.3 Mb ermöglichen sollte. Die Analyse der RILs mit 4 Markern zwischen 2.9 und 4 Mb führte jedoch nicht zu einer weiteren Eingrenzung der QTL Region (Tab. 4), da die untersuchten Linien hauptsächlich den Bur-0 Genotyp aufweisen und keine Korrelation von Col-0 Allelen mit schlechtem Wachstum unter Cd-Stress (< 40%) ersichtlich wurde.

Um den QTL Bereich weiter einzugrenzen wurde die RIL RV243 mit Col-0 gekreuzt. RV243 weist neben der Linie RV371 Bur-0 Allele in der QTL Region auf Chromosom 5 auf, nicht aber in den drei anderen auf Chromosom 3 und 4. Des Weiteren haben beide einen geringen Anteil an Bur-0 Allelen im gesamten Genom, weshalb davon auszugehen ist, dass der beobachtete Wachstumseffekt vor allem durch die Bur-0 Allele im QTL auf Chromosom 5 verursacht wird. RV243 verhält sich phänotypisch wie Bur-0. Es werden zu Col-0, nicht aber zu Bur-0, signifikante Unterschiede im Wachstum unter 2 µM CdCl<sub>2</sub> deutlich (Abb. 19).

**Tab. 4:** Detaillierter Genotyp der ausgewählten RILs. Marker wie von Simon *et al.* [133] angegeben. Die physikalische Position auf Chromosom 5 und die Position in cM, wie im Datensatz für das Programm Map-QTL verwendet, sind angegeben, sowie der Genotyp der jeweiligen Linie an dieser Position. In gelb unterlegt ist der Bereich der signifikantesten LOD Werte, zusätzlich umrahmt ist die Position des höchsten. Relative Wurzellängen der Linien, wie sie für die Errechnung des QTL verwendet wurden sind in % angegeben. Dabei liegt Bur-0 bei 63 %, Col-0 bei 41 %.

Marker	Physik Pos (Mb)	Positon (cM)	RIL Nummer:							
			141	372	310	371	335	243	467	355
*576	0.6	0	B	A	B	A	A	B	A	A
*1587	1.6	4.6	B	A	B	A	A	B	A	B
*2900	2.9	6.1	B	A	B	A	A	B	A	B
	3.1		A	A	B	B	B	B	B	B
	3.3		A	A	B	B	B	B	B	B
	3.6		A	A	B	B	B	B	B	B
	3.8		A	A	B	B	B	B	B	B
*4011	4	9.1	A	A	B	B	A	A	B	B
*5319	5.3	11.5	A	B	A	B	B	A	B	A
*6820	6.8	18.9	A	B	A	A	B	A	B	A
*7442	7.4	20.4	A	B	A	A	B	A	B	A
*8563	8.6	25.1	A	B	A	A	B	A	B	A
			26%	30%	36%	55%	58%	60%	62%	70%

RV243 wurde aus diesem Grund mit Columbia gekreuzt um in der F1 Generation eine Rekombination im QTL Bereich zu ermöglichen und damit den Bereich der Bur-0 Allele in einigen Individuen der F2 Generation zu verkleinern. Durch Markeranalysen wurden 10 Individuen unter 40 untersuchten Nachkommen der F2 identifiziert, welche ein mögliches Rekombinationsereignis in der Region zwischen 2.9 und 4 Mb aufweisen.



**Abb. 19:** Wachstum von RV243 vergleichend mit Col-0 und Bur-0. Die Toleranz von RV243 gegenüber 2 μM CdCl<sub>2</sub> entspricht der von Bur-0, dem toleranten Wildtyp. Dies zeigte sich sowohl bei **(A)** der Untersuchung der absoluten Wurzellänge, als auch bei **(B)** der Ermittlung der relativen Wurzellänge unter Einbeziehung des Wachstums unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind MW ± SD, n = 29-320, 3 bis 21 unabhängige Experimente, statistische signifikante Unterschiede (a-c) ermittelt durch Einwege-Varianzanalyse mit Tukey Test. p<0.05

Bei der Phänotypisierung dieser T Linien wurde allerdings ersichtlich, dass eine eindeutige Unterteilung in Bur-0-ähnliches und Col-0-ähnliches Wachstum nicht mehr möglich war, da nur geringe Unterschiede im Wachstum der T Linien auftraten. Aus diesem Grund konnte deren Cd-Toleranz nicht verlässlich erfasst werden. So war keine Korrelation von dem Genotyp im Intervall zwischen 2.9 und 4 Mb (Tab. 5) und dem Toleranzphänotyp mehr möglich.

Ein Beispiel für einen Widerspruch aus Genotypisierung und Phänotypisierung zeigte sich bei Linie T23. Diese wies ein konstant gutes Wachstum auf. Bei der Genotypisierung konnten jedoch keine Bur-0 Allele in der Region von 2.9 bis 4 Mb detektiert werden. Da die Elternlinie RV243, die einzige von welcher Bur-0 Allele in die T Linien hätten vererbt worden sein könnten, keine Bur-0 Allele in den anderen QTL Regionen enthält, müsste die Cd-Toleranz der T Linie 23 durch den charakterisierten Locus auf Chromosom 5 verursacht werden. Möglicherweise ist hier der Einfluss zu gering um noch Wachstumsunterschiede zwischen Linien, welche sich nur in diesem Locus unterscheiden, erfassen zu können.

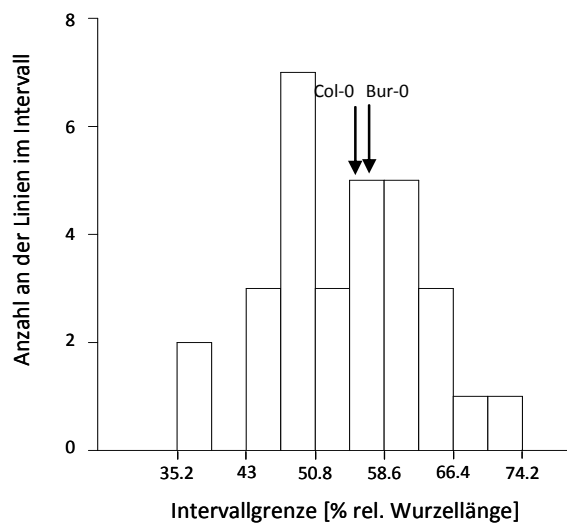
**Tab. 5:** Genotyp der T Linien, entwickelt aus der F2 Generation einer RV243 x Col-0 Kreuzung. Die Bezeichnung der Marker wurde übernommen von Simon *et al.* [133]. Die physikalische Position auf Chromosom 5 und die Position in cM, wie im Datensatz für das Programm Map-QTL verwendet, sind angegeben, sowie der Genotyp der jeweiligen Linie an dieser Position. In gelb unterlegt ist der Bereich der signifikantesten LOD Werte, zusätzlich umrahmt ist die Position des höchsten LOD Wertes. In Prozent sind die Cd-Toleranzen der Linien als rel. Wurzellängen angegeben. Die Toleranz von Col-0 lag in diesen Wachstumstests bei 55.0 % und die von Bur-0 bei 55.7 %.

Linie aus F2 von RV243xCol-0:													
Marker	Physik Pos (bp)	Positon (cM)	RV243	T37	T23	T12	T40	T4	T19	T26	T11	T39	T8
*1587	1587000	4.6	B										
*2900	2900000	6.1	B										
	3109569		B	H	A	A	H	H	H	H	B	A	H
	3343407		B		A	A	H	H	H	H	B	H	H
	3558307		B	H	A	H	H	H	H	H	B	H	H
	3652423		B	H	A				H		B		
	3726019		B	H	A	A/H			H		B		
	3782719		B	H	A	A	H	H	H	A	B	H	H
	3796026 - 3797032		B	B/H							B+Ins		
	3820795 - 3821783		B	H							B		
	3845583 - 3846526		A	A							A		
*4011	3854430	9.1	A	A	A	A			A		A		
*5319	3964110	11.5	A	A	A	A			A		A		
*6820	4011000	18.9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
*7442	5319000	20.4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
*8563	6820000	25.1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
			60%	66%	61%	59%	56%	54%	53%	53%	51%	51%	43%

Diese Hypothese geht von einer vereinfachten Situation aus und lässt zum Beispiel die Effekte von Epistasie außer Acht. Sie wird jedoch unterstützt durch die Betrachtung der Verteilung des rel. Wurzelwachstums aller T Linien. Diese war nicht, wie für einen



segregierenden Locus in einer F2 Generation erwartet, bimodal sondern entsprach einer Normalverteilung (Abb. 20). Statt der erwarteten Eingrenzung des Intervalls durch die T Linien konnte jedoch das Rekombinationsereignis in der Elternlinie RV234 genau lokalisiert werden. Sequenzierung von RV243 und einigen T Linien in den Bereiche von 3.820795 bis 3.821783 Mb und 3.845583 bis 3.846526 Mb erlaubte schließlich die Eingrenzung des Intervalls von 2.9 bis 3.84 Mb (Abb. 18 D, Tab. 4). Damit verringerte sich die Anzahl der Kandidatengene auf 292, von At5G09370 bis At5G11900.



**Abb. 20:** Wachstumsverteilung der T Linien unter 2 µM CdCl<sub>2</sub> in Relation zum Wachstum unter Kontrollbedingungen. Dargestellt ist die Anzahl der T Linien welche ein rel. Wurzelwachstum in den 10 Intervallen, von 35 % bis 74 % zeigen. Das rel. Wachstum von Bur-0 und Col-0 ist durch die Pfeile gekennzeichnet.

## 2.4. Eingrenzung des Anzahl der Kandidatengene durch Zuhilfenahme von Sequenzinformationen und veröffentlichter Microarrays

Die Liste der Gene im eingegrenzten QTL Bereich umfasste 292. Eine mögliche Priorisierung besteht darin, die Sequenzinformationen des *1001 genomes* Projektes dazu zu nutzen, Gene mit Polymorphismen zwischen Bur-0 und Col-0 zu identifizieren. Dabei kann einmal die Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine betroffen sein. Führt dies zu dem Austausch einer konservierten Aminosäure ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Proteinfunktion betroffen ist. Daneben können aber auch Sequenzunterschiede in den 3' und 5' *untranslated regions* (UTRs) zu Veränderungen der Proteinfunktion führen, wenn beispielsweise dadurch die Transkription beeinflusst wird.

Um über diese Eingrenzungsmöglichkeiten die Anzahl an Kandidatengenen zu verringern, wurden Daten über *single nucleotide polymorphisms* SNPs, Insertionen und Deletionen [19] für die Kandidatenliste zusammengetragen. 131 Gene mit insgesamt 396 SNPs wurden mit dem SIFT Algorithmus analysiert [142, 143]. Mit diesem können, auf der Basis von Sequenzalignments, konservierte Bereiche von Proteinen identifiziert und damit Aminosäureaustausche bewertet werden. Eine starke Veränderung in der Struktur und Funktion eines Proteins ist dabei zu erwarten, wenn eine konservierte Aminosäure durch eine Aminosäure mit großen chemischen und physikalischen Unterschieden (z.B. Glycin durch Tryptophan) ersetzt wird. In 15 Genen führten die annotierten SNPs zu einer nicht tolerierten Veränderung in der Aminosäuresequenz (Tab. 6). Daneben enthielten 27 Gene Deletionen in der codierenden Region (3) oder den regulatorisch relevanten 3' und 5' UTRs, und 43 Gene wiesen Insertionen (8 in der codierenden Region) auf.

Für keines dieser Gene lässt sich eine unmittelbare Funktion in der Metallhomöostase ableiten. Sie sind bisher nicht im Zusammenhang mit Metalltransport oder einem anderen toleranzrelevanten Prozess beschrieben. Dazu kommen die Gene aus der Kandidatenliste, welche in einem Microarray als Cd-responsiv erfasst wurden (2.5. Bur-0 vs. Col-0 – der Microarray). Um das, dem QTL auf Chromosom 5 zugrunde liegende, Gen zu identifizieren sind deshalb weitere Informationen erforderlich.

**Tab. 6:** Liste der in der QTL Region zu findenden Gene, welche sich zudem in ihrer Nukleotidsequenz zwischen Bur-0 und Col-0 unterscheiden. Aufgeführte Deletionen, Insertionen und SNPs liegen in der codierenden Region der Gene bzw. in der 3' oder 5' UTR. SNPs führen zu Aminosäureaustauschen.

AGI	Genname	Annotation	Lage
<u>Gene mit nicht tolererbaren SNPs in einem Ökotyp, sowie keiner nicht tolerierbaren Aminosäure in dem jeweils anderen</u>			
AT5G09580		unknown protein	CDS
AT5G09680	RLF	RLF__reduced lateral root formation	CDS
AT5G10060		ENTH/VHS family protein	CDS
AT5G10120		Ethylene insensitive 3 family protein	CDS
AT5G10720	AHK5	AHK5_CK12_HK5__histidine kinase 5	CDS
AT5G10880		tRNA synthetase-related / tRNA ligase-related	CDS
AT5G11027		unknown protein	CDS
AT5G11080		Ubiquitin-like superfamily protein	CDS
AT5G11220		unknown protein	CDS
AT5G11310		Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	CDS
AT5G11350		DNAse I-like superfamily protein	CDS
AT5G11416		unknown protein	CDS
AT5G11610		Exostosin family protein	CDS
AT5G11690	AtTIM17-3	ATTIM17-3_TIM17-3__translocase inner membrane subunit 17-3	CDS
AT5G11760		unknown protein	CDS
<u>Gene mit Insertionen</u>			
AT5G09445		unknown protein	3' UTR
AT5G09462	CPuORF42	CPuORF42__conserved peptide upstream open reading frame 42	5' UTR
AT5G09463	CPuORF41	CPuORF41__conserved peptide upstream open reading frame 41	5' UTR
AT5G09510		Ribosomal protein S19 family protein	3' UTR

Vorsetzung von Tab. 6

AT5G09550	GDI	GDP dissociation inhibitor family protein / Rab GTPase activator family protein	3' UTR
AT5G09590	HSC70-5	HSC70-5_MTHSC70-2__mitochondrial HSO70 2	CDS
AT5G09670		loricrin-related	CDS
AT5G09730	AtBX3	ATBX3_ATBXL3_BX3_BXL3_XYL3__beta-xylosidase 3	5' UTR
AT5G09750	HEC3	HEC3__basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	CDS
AT5G09880		Splicing factor, CC1-like	3' UTR
AT5G09970	CYP78A7	CYP78A7__cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 7	5' UTR
AT5G09980	PRO	PROPEP4__elicitor peptide 4 precursor	3' UTR
AT5G10040		unknown protein	CDS
AT5G10140	AGL25	AGL25_FLC_FLC_FLF__K-box region and MADS-box transcription factor family protein	3' UTR
AT5G10230	ANN7	ANN7__ANNAT7__annexin 7	CDS
AT5G10240	ASN3	ASN3__asparagine synthetase 3	3' UTR
AT5G10300	AtHNL	AtHNL_ATMES5_HNL_MES5__methyl esterase 5	3' UTR
AT5G10440	CYCD4;2	CYCD4;2__cyclin d4;2	3' UTR
AT5G10590		unknown protein	CDS
AT5G10770		Eukaryotic aspartyl protease family protein	3' UTR
AT5G10930	CIPK5	CIPK5_SnRK3.24__CBL-interacting protein kinase 5	5' UTR
AT5G10940	ASG2	ASG2__transducin family protein / WD-40 repeat family protein	3' UTR
AT5G10960		Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	3' UTR
AT5G11000		Plant protein of unknown function (DUF868)	CDS
AT5G11090		serine-rich protein-related	5' UTR
AT5G11160	APT5	APT5__adenine phosphoribosyltransferase 5	5' UTR
AT5G11220		unknown protein	3' UTR
AT5G11240		transducin family protein / WD-40 repeat family protein	3' UTR
AT5G11260	HY5	HY5_TED 5__Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	3' UTR
AT5G11270	OCP3	OCP3__overexpressor of cationic peroxidase 3	3' UTR
AT5G11280		unknown protein	3' UTR
AT5G11300	CYC2B	CYC2BAT_CYC3B_CYCA2;2__mitotic-like cyclin 3B from Arabidopsis	3' UTR
AT5G11310		Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	3' UTR
AT5G11412		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	CDS
AT5G11440	CID5	CID5_IPD1__CTC-interacting domain 5	3' UTR
AT5G11560		catalytics	3' UTR
AT5G11590	TINY2	TINY2__Integrase-type DNA-binding superfamily protein	5' UTR
AT5G11600		unknown protein	3' UTR
AT5G11700		best <i>Arabidopsis thaliana</i> protein match is: glycine-rich protein (AT4G32920.3)	3' UTR
AT5G11730		Core-2/l-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein	5' UTR
AT5G11750		Ribosomal protein L19 family protein	3' UTR
AT5G11790	NDL2	NDL2__N-MYC downregulated-like 2	3' UTR
AT5G11800	ATKEA6	ATKEA6_KEA6__K+ efflux antiporter 6	5' UTR

#### Gene mit Deletionen

AT5G09410	CAMTA1	CAMTA1_EICBP.B__ethylene induced calmodulin binding protein	3' UTR
AT5G09450		Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3' UTR
AT5G09462	CPuORF42	CPuORF42__conserved peptide upstream open reading frame 42	5' UTR
AT5G09590	HSC70-5	HSC70-5_MTHSC70-2__mitochondrial HSO70 2	CDS
AT5G09750	HEC3	HEC3__basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	CDS
AT5G09890		Protein kinase family protein	3' UTR
AT5G09970	CYP78A7	CYP78A7__cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 7	5' UTR
AT5G10100	TPPI	TPPI__Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	3' UTR
AT5G10130		Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	5' UTR
AT5G10170	AtMIPS3	ATMIPS3_MIPS3__myo-inositol-1-phosphate synthase 3	5' UTR
AT5G10200		ARM-repeat/Tetratricopeptide repeat (TPR)-like protein	3' UTR
AT5G10230	ANN7	ANN7__ANNAT7__annexin 7	3' UTR
AT5G10320		unknown protein	3' UTR
AT5G10470	KAC1	KAC1_KCA1__kinesin like protein for actin based chloroplast movement 1	5' UTR
AT5G10580		Protein of unknown function, DUF599	5' UTR
AT5G10740		Protein phosphatase 2C family protein	3' UTR
AT5G10930	CIPK5	CIPK5_SnRK3.24__CBL-interacting protein kinase 5	5' UTR
AT5G11090		serine-rich protein-related	5' UTR
AT5G11110	AtSPS2	ATSPS2F_KNS2_SPS1_SPS2F_SPSA2__sucrose phosphate synthase 2F	3' UTR
AT5G11160	APT5	APT5__adenine phosphoribosyltransferase 5	5' UTR
AT5G11190	SHN2	SHN2__Integrase-type DNA-binding superfamily protein	CDS
AT5G11260	HY5	HY5_TED 5__Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	5' UTR
AT5G11280		unknown protein	3' UTR
AT5G11430		SPOC domain / Transcription elongation factor S-II protein	5' UTR

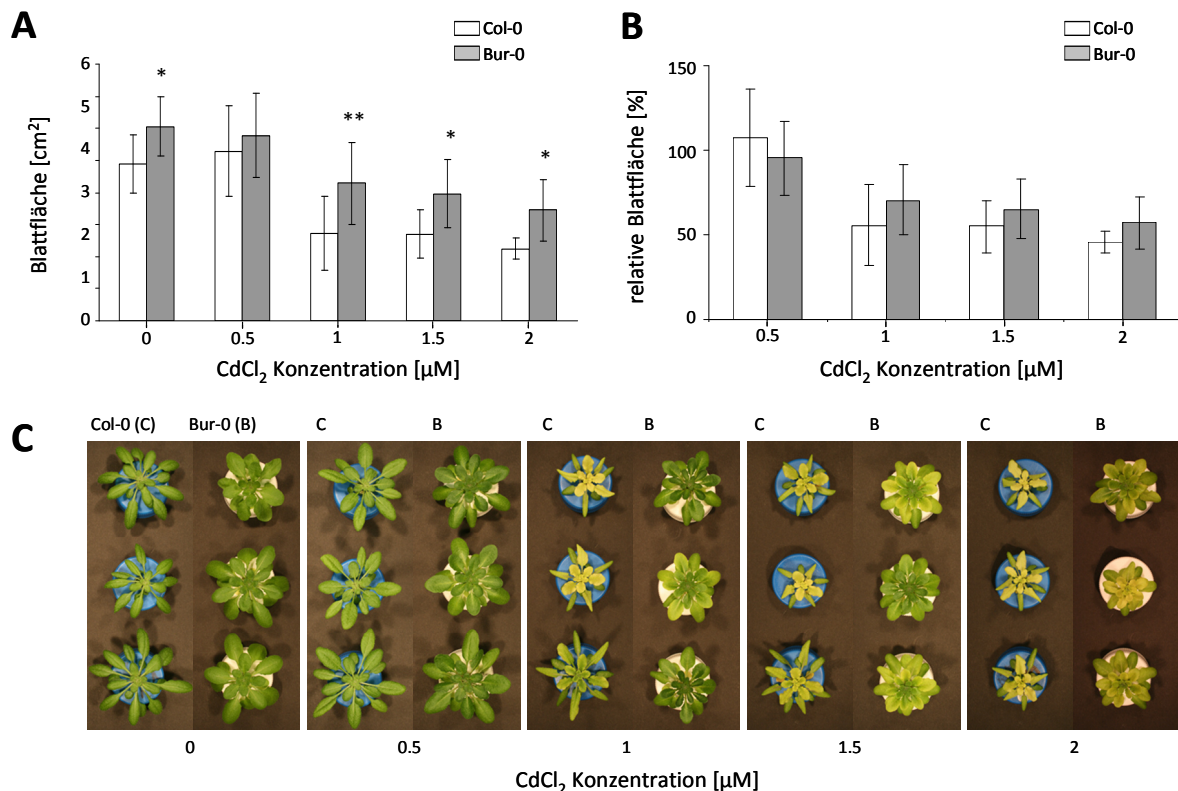
Vorsetzung von Tab. 6

AT5G11440	CID5	CID5_IPD1__CTC-interacting domain 5	3' UTR
AT5G11590	TINY2	TINY2__Integrase-type DNA-binding superfamily protein	3' UTR
AT5G11750		Ribosomal protein L19 family protein	5' UTR

### 2.5. Bur-0 vs. Col-0 – der Microarray

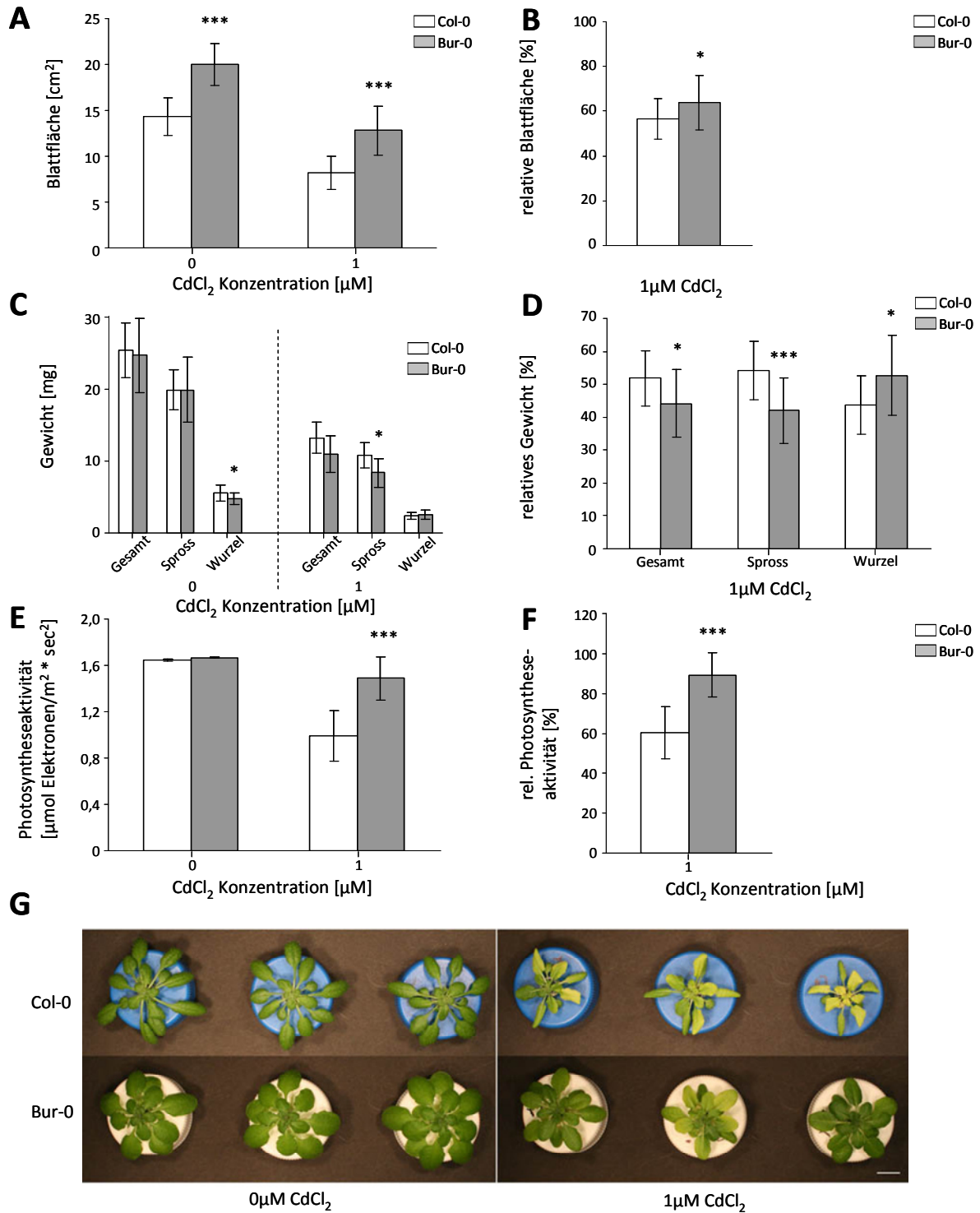
Eine weitere Strategie zur Identifikation des Gens verantwortlich für die höhere Cadmiumtoleranz von Bur-0 ist der genomweite Vergleich der Genexpression in Bur-0 und Col-0 unter Cadmiumstress. Dafür wurde ein Microarrayexperiment durchgeführt. Wachstumsunterschiede wurden zunächst in einem Vorversuch festgestellt und Unterschiede in der Blattfläche von 6 Wochen alten Pflanzen nach 1-wöchigem Cd-Stress erfasst. Die Pflanzen wurden dabei im hydroponischen Falconsystem Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 5 und 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  ausgesetzt (Daten nicht gezeigt). Cd beeinflusste innerhalb einer Woche das Wachstum von beiden *A. thaliana* Ökotypen, was durch die Bestimmung der Blattfläche gezeigt werden konnte. Unter 0,5  $\mu\text{M}$  Cd-Behandlung konnte für Bur-0 ein Wachstum von  $113 \pm 13\%$  und für Col-0 von  $116 \pm 16\%$  erfasst werden. Die rel. Blattfläche verringerte sich durch höhere Konzentrationen von Cd und erreichte schließlich in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $31 \pm 15\%$  und  $38 \pm 5\%$ . In einem zweiten Vorversuch wurden Konzentrationen von 0,5, 1, 1,5 und 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  verwendet um eine Stressantwort zu induzieren, welche Unterschiede zwischen den Ökotypen in der Ausprägung der Blattrosette sichtbar machen, welche jedoch noch nicht zu einer starken Schädigung der Pflanzen führen (Abb. 21). Dabei zeigten sich leichte Wachstumsunterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 unter Kontrollbedingungen und unter 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  größere, hoch signifikante Unterschiede (Abb. 21 A).

Unter 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , der niedrigsten Konzentration die deutliche Effekte auf das Wachstum hervorrief und bei der Unterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 dokumentiert werden konnten, wurden im Folgenden zwei unabhängige Wachstumsexperimente für die Microarrayanalysen durchgeführt. Neben der Kollektion von Wurzelmaterial für die Expressionsanalyse unter Kontrollbedingungen und nach Cd-Behandlung, wurde auch der Phänotyp durch das Erfassen der Blattfläche dokumentiert. Dabei konnte erneut eine höhere Toleranz von Bur-0 nachgewiesen werden (Abb. 22 A, B, G). Um diesen Unterschied durch andere Parameter zu dokumentieren wurde ein dritter Versuch durchgeführt (Abb. 22 C-F).



**Abb. 21:** Darstellung der Blattflächen von Bur-0 und Col-0 nach 7 Tagen Cd-Behandlung im Falcon-Anzuchtsystem. **(A)** Blattfläche der beiden Ökotypen unter 5 verschiedenen Wachstumsbedingungen. Bur-0 und Col-0 unterschieden sich signifikant unter Kontrollbedingungen sowie bei 1 bis 2 µM Cadmiumstress. Nicht angegeben sind die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,001$ ) innerhalb eines Ökotyps im Vergleich zum Wachstum unter Kontrollbedingungen für alle Konzentrationen ab 1 µM CdCl<sub>2</sub>. (Holm-Sidak Test). **(B)** Darstellung der auf das Kontrollwachstum normalisierten Blattflächen. **(C)** Wachstum von Pflanzen nach 7 Tagen unter Kontrollbedingungen bzw. Cd-Stress.

Von diesem wurde das Pflanzenmaterial nicht für die RNA Extraktion und anschließende Transkriptanalyse mittels Microarray verwendet. Stattdessen konnten Gewicht und Photosyntheserate der Pflanzen ermittelt werden. Dies war bei der Anzucht der für die Microarrayanalyse bestimmten Pflanzen nicht möglich, da es bei dieser Messung zu mechanischen Belastungen der Pflanzen kommt, durch welche die Transkription beeinflusst werden kann. Im Gewicht der Pflanzen konnten nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Ökotypen festgestellt werden. Es zeigte sich dabei sogar ein geringeres Gesamt- und Sprossgewicht von Bur-0 unter Cd-Stress im Vergleich mit Col-0 (Abb. 22 C). So kann die Toleranz von Bur-0 gegenüber Cd nur durch Analyse des Wurzelgewichtes dokumentiert werden. Bur-0 Wurzeln sind unter Cd-Stress signifikant schwerer als Col-0 Wurzeln (Abb. 22 D). Der dritte erfasste Parameter zur Dokumentation des Toleranzphänotypes, die Photosyntheseaktivität, zeigte höchst signifikante Unterschiede für die beiden Ökotypen.



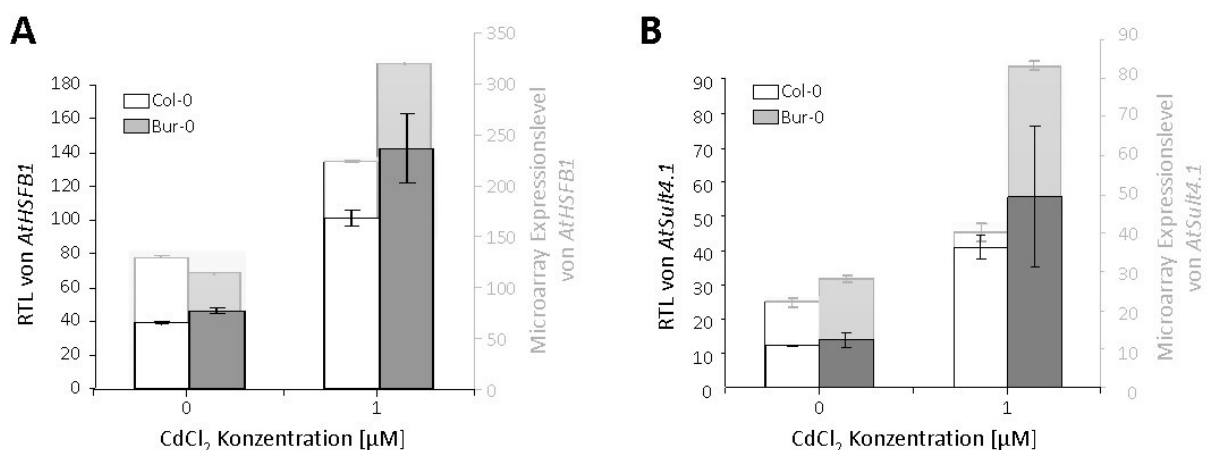
**Abb. 22:** Phänotypisierung der Microarraypflanzen angezogen unter Kontrollbedingungen und 1 μM CdCl<sub>2</sub> im Falcon-Anzuchtsystem. Relative Werte beziehen sich auf das Wachstum unter Kontrollbedingungen. Absolute (A) sowie relative (B) Blattflächen der Pflanzen der beiden unabhängigen Microarrayanzuchten.  $n_{\text{total}} = 30$ . Absolute (C) sowie relative (D) Gesamt-, Spross- und Wurzelmasse von Bur-0 und Col-0 unter Anzuchtbedingungen entsprechend denen der Microarrayanalyse, sowie absolute (E) sowie relative (F) Photosyntheseaktivität ermittelt aus der Chlorophyllfluoreszenz dieser Pflanzen.  $n = 15$  (G) Jeweils drei Exemplare der Pflanzen beider Ökotypen, verwendet für die Microarrayanalyse unter Kontrollbedingungen und Cd-Stress. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD. Signifikante Unterschiede zwischen Ökotypen wurden mittels zweifache-Varianzanalyse (A,C-E) oder Einwege-Varianzanalyse (B,F) mit Tukey Test ermittelt. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Bereits für die absolute Photosyntheseaktivität wird die Toleranz von Bur-0 deutlich, da sich die Ökotypen unter Kontrollbedingungen nicht unterscheiden, Bur-0 dagegen unter Cd-Stress eine sehr viel höhere Aktivität aufweist. Die Berechnung der relativen Aktivitäten ergab für Bur-0 eine Cd-bedingte Reduktion um nur 11%, während die Aktivität von Col-0 um 40% reduziert war (Abb. 22 E, F).

Nach der RNA Extraktion aus den Wurzeln der Pflanzen, wurde sie mit dem *GeneChip® 3' IVT Express Kit* von Affymetrix in aRNA umgeschrieben und mit dem *GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array* hybridisiert. Zur Auswertung der Rohdaten wurde das Statistikprogramm „R“ verwendet.

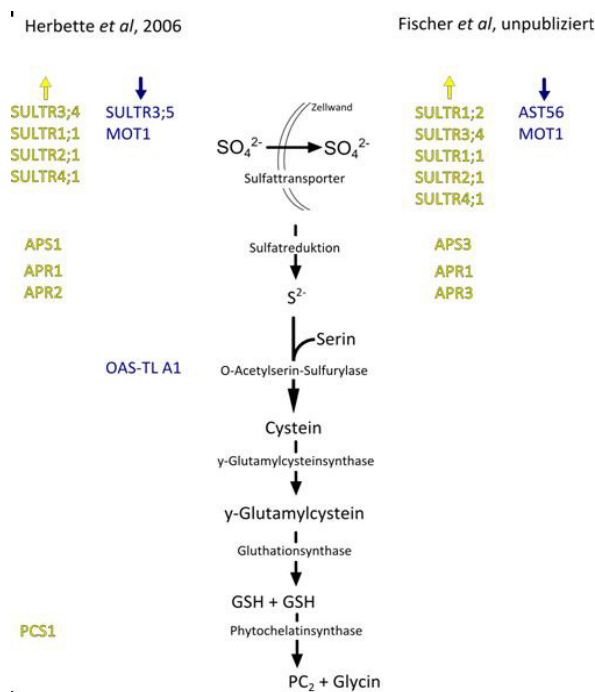
### 2.5.1. Validierung des Microarrays

Für die Bestätigung der mit dem Microarray ermittelten Expressionsunterschiede, wurde für zwei Gene eine quantitative *Real Time* PCR (q RT-PCR) durchgeführt (Abb. 23). Dabei zeigte sich für beide Gene eine sehr gute Übereinstimmung der relativen Transkriptlevel (RTL), errechnet aus den Ergebnissen der q RT-PCR und der Expressionsniveaus der Microarrayanalyse. Für beide war eine Induktion der Expression unter Cd-Stress nachweisbar, welche wiederum in Bur-0 stärker ausfiel als in Col-0.



**Abb. 23:** Bestätigung der Microarray Daten. Die Transkriptanalyse der eines Hitzeschockfaktorgens *AtHSFB1* (**A**) und eines Sulfattransporters *AtSult4.1* (**B**) mittels q RT-PCR, wurde für die Kontrolle der mittels Microarray erhobenen Expressionslevel herangezogen. Das relative Transkriptlevel (RTL) (linke Achse) erfasst eine ähnliche Cd-Responsivität wie durch die in der Microarrayanalyse ermittelten Expressionslevel (rechte Achse) gezeigt.

Da die Pflanzen unter natürlichen Bedingungen ebenfalls eher geringen Cd-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum hinweg ausgesetzt sind, wurden die Bedingungen für diese Microarrayanalyse dementsprechend angepasst. Nun sollte bestätigt werden, dass unter der gewählten Cd-Behandlung mit nur 1  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  für einen Zeitraum von 1 Woche eine ähnliche Cd-Responsivität zu beobachten ist, wie sie bereits zuvor unter deutlich schwererem Stress von 50  $\mu\text{M}$  von Herbette *et al.* [85] gezeigt wurde. Für diesen Zweck wurde die Regulation von Genen der Schwefelassimilation mit der Regulation dieser Gene erfasst von Herbette *et al.* 2006 verglichen. Der Zusammenhang von Schwefelassimilation und Cadmiumdetoxifikation auf der Transkriptebene ist bereits hinreichend beschrieben [85, 144–147]. Grund für die verstärkte Schwefelassimilation unter Cd-Stress ist die Produktion von PCs als Cd-Detoxifizierer. In einem Schema der Schwefelassimilation (Abb. 24) ist ersichtlich, dass eine Schwefelaufnahme Voraussetzung für die Produktion von Cystein ist, welches wiederum als Substrat für die Bildung von GSH benötigt wird, aus welchem PCs synthetisiert werden.



**Abb. 24:** Schematische Darstellung der Schwefelassimilation. Gene des Schwefelmetabolismus welche durch Cd in ihrer Regulation verändert wurden sind neben dem jeweils vom Genprodukt katalysiertem Reaktionsschritt/Transportes aufgeführt. Gene welche mind. 2fach Induziert wurden sind gelb dargestellt, 2fach reprimierte Gene sind in blau dargestellt.

PCs komplexieren  $\text{Cd}^{2+}$  und ermöglichen eine Lagerung von dem in dieser Form nicht-toxischen Cd in der Vakuole. In Abb. 24 sind Sulfattransporter, induziert bzw. reprimiert



durch Cd, aufgeführt. Dabei zeigt sich eine gute Übereinstimmung der beiden Microarrayanalysen. Die 4 Sulfattransporter, welche durch 50  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> induziert werden, konnten auch in der hier durchgeführten Microarrayanalyse als Cd-induziert identifiziert werden. Ebenso zeigte sich die Induktion von jeweils einer der 4 ATP Sulfurylasen welche Sulfat für die Assimilation aktivieren und von jeweils zwei der für den nächsten Schritt benötigten Adenosinephosphosulfat (APS) Reduktasen.

In Col-0 haben 0.67 % der induzierten Gene eine Funktion in der S-Assimilation und in Bur-0 0.22 % der reprimierten Gene. Dabei liegt der Anteil an S-Assimilationsgenen an dem Gesamtpool an exprimierten Genen bei 0.06%.

Damit konnten bekannte Cd-induzierte Reaktionen bestätigt werden. Zudem wurden durch die Microarrayanalyse verlässliche Daten erhoben welche sich durch andere Techniken bestätigen lassen.

### 2.5.2. Microarray Auswertung

Durch die Microarrayanalyse konnten Rückschlüsse auf die Genexpression in Bur-0 und Col-0 gezogen werden. Für diese Feststellung wurde die Transkriptabundanz unter den zwei Bedingungen (Kontrolle oder Cd-Behandlung) oder in den beiden Genotypen (Bur-0 und Col-0) miteinander verglichen. Dabei wurde die Induktion und Repression von Genen festgestellt. Eine höhere Transkriptabundanz wurde dabei als Geninduktion interpretiert, eine niedrigere Transkriptabundanz als Genrepression.

Zunächst konzentrierte die Auswertung sich dabei auf diejenigen Gene, welche im zuvor eingegrenzten QTL Intervall lagen (2.5.2.1. Differenzielle Expression der Gene des QTL Intervalls). Dies diente dem Zweck Kandidatengene für die höhere Cd-Toleranz von Bur-0 zu identifizieren und es wurden deshalb ausschließlich Gene ausgewählt deren Responsivität sich in den Ökotypen unterschied. Mit diesen Genen wurde eine Clusteranalyse durchgeführt, um diejenigen mit ähnlichem Expressionsverhalten zu identifizieren.

Danach fand eine genomweite Analyse der Transkription statt (2.5.2.2. genomweite Analyse der Transkriptionsveränderung vermittelt durch moderate Cd-). Dadurch sollten Erkenntnisse über die Cd-Antwort in *A. thaliana* gewonnen werden. Ein Vergleich der Genresponsivitäten in den beiden Ökotypen ermöglicht dabei eine ökotypspezifische Betrachtung sowie eine Analyse der generellen Cd-Antwort. So sollten wichtige Prozesse die in Antwort auf eine Cd-Behandlung regulatorisch verändert werden, durch eine

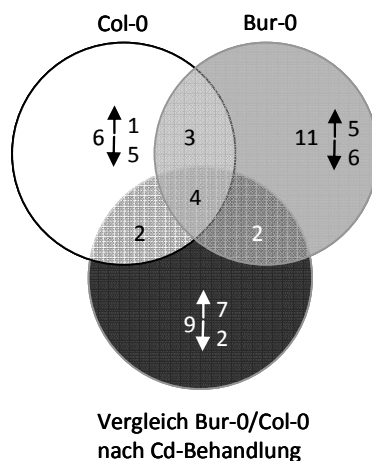
Anreicherung funktioneller Gruppen unter Cd-responsiven Genen detektiert werden. Zunächst wurde dabei eine Anreicherung von BIN Klassen in 6 zuvor definierten Gengruppen ermittelt. BINs sind hierarchische Kategorien die über die biologische Funktion eines Gens informieren. 36 BIN Gruppen sind definiert, die sich wiederum in 160 *subBINs* aufspalten [148]. Die 6 Gengruppen in welchen nach einer Anreicherung einer biologischen Funktion durch eine Überrepräsentation einer BIN Gruppe gesucht wurde, wurden im Vorfeld der Analyse definiert. Entscheidend war die Expressionsänderung durch Cd-Behandlung, sichtbar an einem mindestens 2fachen Signalunterschied zwischen Kontrollproben und solchen nach Cd-Behandlung. Dabei wurde zwischen Geninduktion und Genrepression unterschieden, sowie zwischen Genen die nur in einem der beiden Ökotypen responsiv waren und den Genen die in beiden Ökotypen Cd-responsiv waren. In einer zweiten genomweiten Analyse der Expression wurden die Gene für eine Clusteranalyse ausgewählt welche durch die Cd-Behandlung eine mindestens 2fach veränderte Transkriptmenge aufwiesen. Basierend auf dieser Clusteranalyse von 2559 Genen wurden 6 Hauptcluster (I bis VI) und in einer zweiten, feineren Unterteilung 16 Nebencluster (1 – 16) definiert. Diese Cluster enthielten Gruppen von Genen mit einem spezifischen Expressionsverhalten. Innerhalb der Cluster wurde mit Hilfe des „ProfCom“ *web tools* nach Anreicherungen von *Gene Ontology* (GO) Klassen gesucht [149]. Die *Gene Ontologies* sind hierarchische Kategorien, die ebenfalls Informationen über die Funktion der Gene enthalten, welchen sie zugeordnet werden können. Anhand dieser beiden Analysen sollten Informationen über die generelle Cd-Antwort ebenso abgeleitet werden, wie Aussagen über Toleranzmechanismen getroffen werden konnten und die molekularen Auswirkungen von toxischen Schwermetallen sichtbar wurden.

In einem dritten Abschnitt (2.5.2.3. Cd-Responsivität bekannter Schwermetallgene in Bur-0 und Col-0) wurde die Expression von Genen analysiert, für welche bereits eine Funktion in der Schwermetallhomöostase oder Schwermetalltoleranz bekannt ist. Aufgrund des durch die Microarrayanalyse ermittelten Expressionsniveaus wurde eine Clusteranalyse dieser Gene durchgeführt.

### 2.5.2.1. Differenzielle Expression der Gene des QTL Intervalls

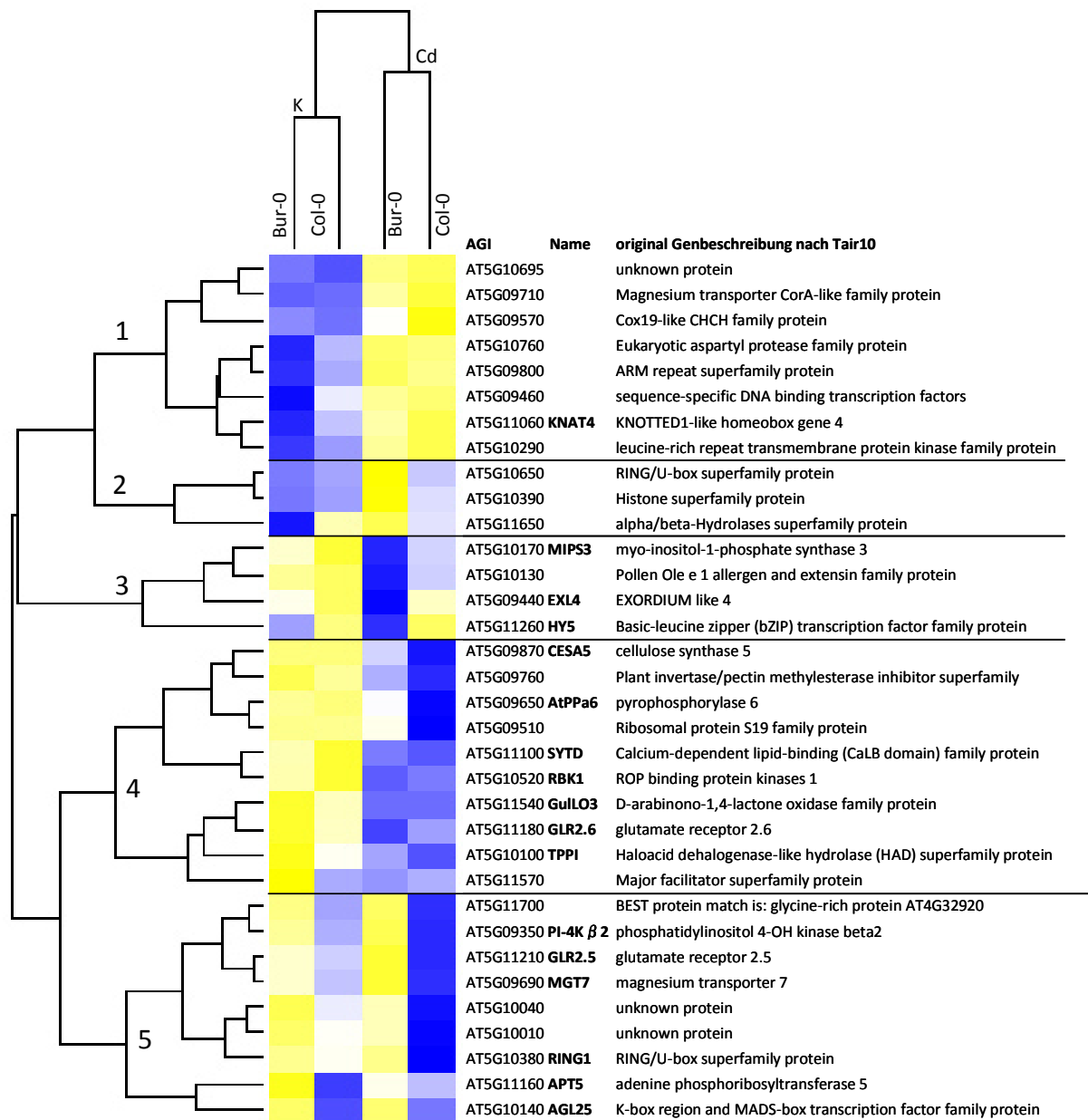
Von den 292 Genen im Bereich der QTL Region (At5G09370 – At5G11900) wurden 183 Gene mit der Microarrayanalyse untersucht. Die Expression der Gene in Bur-0 und Col-0 unter

Kontrollbedingungen und Cadmiumbehandlung wurden miteinander verglichen und die Expressionsänderung als „Fold Change“ (xfach) für jedes Gen ermittelt. Gene welche weniger als 2fach induziert oder reprimiert wurden, wurden als Kandidatengene ausgeschlossen. 20 Gene wiesen in Bur-0 eine veränderte Expression auf (grau in Abb. 25) und 15 zeigten eine veränderte Expression in Col-0 (weiß in Abb. 25) erzeugt durch die Behandlung mit Cadmiumchlorid. Außerdem wiesen 17 Gene des QTL Bereiches nach Cd-Behandlung eine mindestens 2fach unterschiedliche Expression auf (dunkel grau in Abb. 25). Anhand dieser Zahlen zeigte sich, dass im QTL Bereich keine deutlichen Unterschiede in der Responsivität zwischen Bur-0 und Col-0 auftreten.



**Abb. 25:** Schnittmenge der Gene des QTL Bereiches mit spezifischer Regulation als Venn-Diagramm. Die Anzahl an induzierten Genen, sowie der Gene die in Bur-0 nach Cd-Behandlung stärker exprimiert werden als in Col-0 ist durch eine aufwärtige Pfeilrichtung gekennzeichnet. Dazu entgegengesetzt sind reprimierte Gene und solche die in Col-0 nach Cd-Behandlung stärker Exprimiert sind durch einen nach unten weisenden Pfeil dargestellt.

Durch eine Clusteranalyse konnten Gengruppen mit distinktem Expressionsverhalten genauer definiert werden (Abb. 26). In Cluster 1 waren Gene enthalten, welche eine Induktion, in Cluster 4 solche die Repression in beiden Ökotypen zeigten. Darunter enthalten waren potenzielle Kandidatengene. Die Beschreibung der Gene wurde in der Originalsprache angegeben, da Übersetzungen teilweise zum Verlust von Informationen führen. Ein Kandidatengen war zum Beispiel At5G09690, ein *Magnesium transporter 7* welcher nur in Bur-0 induziert wurde. Auch für At5G09440 oder EXL4 ist anhand der Expressionsdaten ein Cd-bedingter Funktionsunterschied zwischen den Ökotypen denkbar.



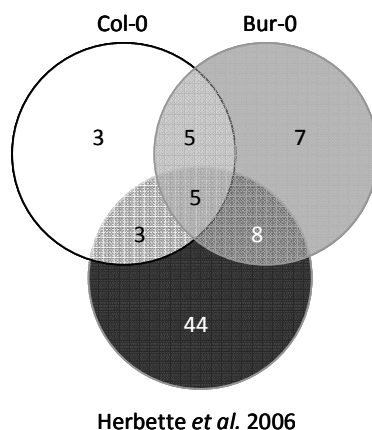
**Abb. 26:** Hierarchische Clusteranalyse der differenziell regulierten Gene im QTL auf Chromosom 5, durchgeführt mit R Vers. 3.1.0. Gelb: starke Expression abgeleitet von hohen Transkriptleveln, blau: schwache Expression abgeleitet von geringem Transkriptlevel. Die AGI Codes der jeweiligen Gene, sofern vorhanden die Gennamen und die original Annotierung der Gene aus Tair10 sind neben den graphisch veranschaulichten Expressionsleveln angegeben.

Dieses Phosphat-responsive Gen wurde in Bur-0 deutlich stärker reprimiert als in Col-0, was zu einer deutlich geringeren Expression unter Cd-Behandlung führte (Cluster 3, Abb. 26). Unterschiedliche Regulation zeigten Gene in Cluster 2, 3 und 5. In Cluster 2 waren zum Beispiel Gene enthalten die in Bur-0, aber nicht in Col-0 unter Cadmiumstress induziert wurden und deren Expressionslevel in cadmiumgestressten Bur-0 Individuen höher lagen als in Col-0 (Tab. 7). Keines ist bisher genauer charakterisiert.

**Tab. 7:** 3 Gene der auf Chromosom 5 eingegrenzten QTL Region welche, durch die Clusteranalyse (vgl. Abb. 25 sowie Cluster 2 Abb. 26) gezeigt, ein Expressionsverhalten aufweisen welches den Cd-Toleranzunterschied erklären könnte.

AGI	Name: Beschreibung	Bur-0		Col-0		Expressions- änderung in Bur- 0 (xfach)	Expressions- änderung in Col-0 (xfach)
		K	Cd	K	Cd		
AT5G10390	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	4.1	8.6	4.5	5.0	2.1	1.1
AT5G10650	protein kinase family protein	47.3	122.5	52.5	57.5	2.6	1.1
AT5G11650	hydrolase, alpha/beta fold family protein	41.2	96.5	78.6	63.5	2.3	0.8

Cd-responsive Gene der QTL Region in Bur-0 und Col-0 wurden mit Genen verglichen welche bereits zuvor in Col-0 als Cd-responsiv identifiziert wurden (Abb. 27). Dabei wurden 7 Gene identifiziert, welche nur in Bur-0 nach 1-wöchigem Stress in ihrer Expression verändert waren und sich dabei nicht responsiv in der Analyse von Herbette *et al.* 2006 zeigten, bei welcher Col-0 für 2 bis 30h mit Cd gestresst wurde.



**Abb. 27:** Vergleich responsiver Gene des QTL Bereiches mit Daten von Herbette *et al.* 2006. Dargestellt ist die Schnittmengen der Gene in de QTL Region auf Chromosom 5, welche laut Herbette *et al.* 2006 [85] Cd-responsiv sind, mit Cd-responsiven Genen in Bur-0 und Col-0 nach 1-wöchigem Stress.

Eine Liste dieser Gene ist in Tab. 8 angegeben. Hier ist auch ihre Reaktivität in Bur-0 Wurzeln nach 1-wöchigem Cd-Stress zu sehen. Für Col-0 wurden dagegen nur Faktoren von kleiner als 2 erreicht, d. h., es wurden keine mindestens 2fachen Änderungen der Expression beobachtet. Auch die Expression unter Cd-Stress zwischen den beiden Ökotypen wurde angegeben. Dabei ist zu sehen, dass nur das Gen RBK1, auch eine höhere Expression in Bur-0 unter Cd-Stress erreichte als in Col-0. Für keines der Gene ist bisher ein Bezug zur Schwermetallhomöostase bekannt.

**Tab. 8:** Gene der QTL Region welche in Bur-0 durch Cd in ihrer Expression verändert sind. Diese Gene sind zudem in Col-0 weder nach mehrstündigem [85] noch 1-wöchigem Cd-Stress responsiv. *Fold Change* a gibt dabei die Expressionsveränderung in Xfach in Bur-0 nach Cd-Stress an. ind. Gene sind stärker unter Cd-Stress exprimiert, repr. Gene sind schwächer exprimiert. *Fold Change* b gibt an wie viel stärker (ind.) oder schwächer (repr.) das Gen unter Cd-Stress in Bur-0 exprimiert ist als in Col-0. *Fold Change* c gibt die Expressionsveränderung in Xfach in Col-0 nach Cd-Stress an. ind. Gene sind stärker unter Cd-Stress exprimiert, repr. Gene sind schwächer exprimiert.

AGI	Genname	Beschreibung	Fold Change <sup>a</sup>		Fold Change <sup>b</sup>		Fold Change <sup>c</sup>	
AT5G09460		sequence-specific DNA binding transcription factors	2.11	ind.	1.08	repr.	1.40	ind.
AT5G10520	RBK1	ROP binding protein kinases 1	2.59	ind.	2.13	ind.	1.09	ind.
AT5G10950		Tudor/PWWP/MBT superfamily protein	1.68	ind.	1.03	repr.	1.34	ind.
AT5G11540	GulLO3	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein	2.42	repr.	1.01	repr.	1.68	repr.
AT5G11570		Major facilitator superfamily protein	9.51	repr.	1.16	repr.	1.02	ind.
AT5G11650		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	2.34	ind.	1.52	ind.	1.24	repr.
AT5G11860	SSP5	SCP1-like small phosphatase 5	1.67	ind.	1.28	ind.	1.32	ind.

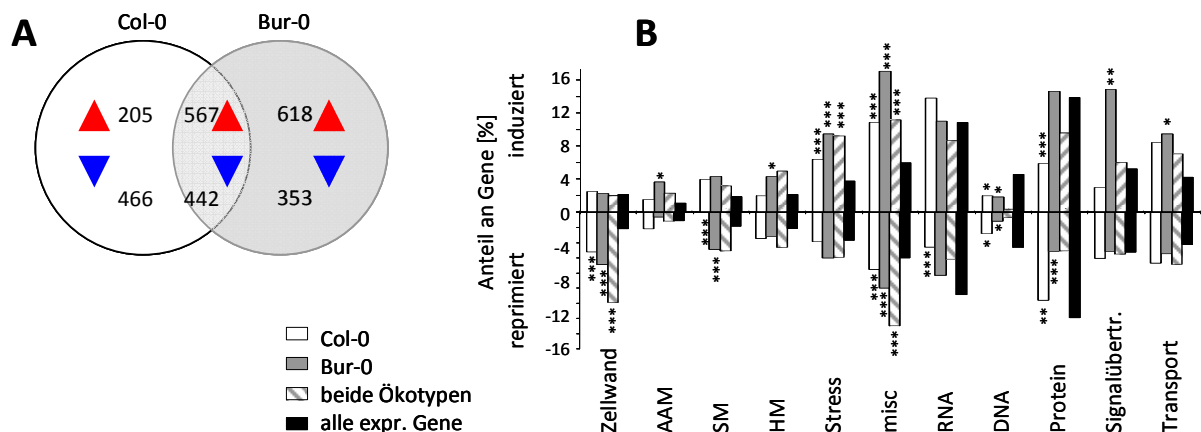
#### 2.5.2.2. genomweite Analyse der Transkriptionsveränderung vermittelt durch moderate Cd-Behandlung

Neben der Auswertung der Microarraydaten in Bezug auf die im Mapping detektierten QTLs können die Expressionsunterschiede zwischen Cd-behandelten Pflanzen und Kontrollpflanzen auch Aufschluss über generelle Mechanismen der Cadmiumdetoxifizierung geben. Dafür wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt.

Von 16965 Genen wurden 1193 in Bur-0 durch Cadmium induziert (>2fach stärker exprimiert), 772 in Col-0. 785 Gene wurden in Bur-0 durch Cd reprimiert, 910 in Col-0. 1009 Gene waren davon in beiden Ökotypen responsiv, der Rest wurde jeweils unterschiedlich reguliert (Abb. 28 A). Das in Bur-0 am stärksten reprimierte Gen war At5g46890. Es codiert für ein Protein, welches als „*Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein*“ annotiert ist. Durch die Cd-Behandlung der Pflanzen wurde es 98fach in seiner Expression reprimiert. Das in Bur-0 am zweitstärksten reprimierte Gen At5G50590 (AtHSD4), eine Hydroxysteroid Dehydrogenase, wurde dagegen nur 36fach reprimiert. Die größte Induktion zeigte At4G33710, ein nicht näher charakterisiertes Gen annotiert als „*CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein*“, welches 388fach induziert wurde. In Col-0 waren ebenfalls At5g46890 und At4G33710 am stärksten durch Cd reprimiert und induziert.

Eine Unter- bzw. Überrepräsentationsanalyse in den 6 Gruppen (induziert in Bur-0 allein oder in Col-0 allein und in beiden Ökotypen, reprimiert in Bur-0 oder Col-0 oder beiden Ökotypen) ergab deutlich unterschiedliche Anreicherungen an funktionellen Klassen (BINs)

für die beiden Ökotypen (Abb. 28 B). Dabei wurde der Anteil der Gene, welche einer funktionellen Klasse zugeordnet werden können, in Bezug auf die Anzahl aller in der Gruppe (z.B. spezifisch in Bur-0 induziert) vertretener Gene bestimmt. Der Vergleich mit der Größe dieser funktionellen Klasse (ermittelt aus dem Anteil der insgesamt in der Klasse vertretenen Gene zu allen in *A. thaliana* exprimierten Genen) ließ den Schluss auf Unter- oder Überrepräsentation zu. Zudem wurde die Signifikanz in Bezug auf Anreicherungen in anderen funktionellen Gruppen mittels Fischer Tests und Bonferroni Korrektur ermittelt.



**Abb. 28:** Genomweite Analyse der Transkription durch eine BIN-Gruppen Überrepräsentationsanalyse. **(A)** Graphische Darstellung der Anzahl an responsiven Genen in den Ökotypen Bur-0 und Col-0 nach 1-wöchigem Cd-Stress. **(B)** Signifikant Über- und Unterrepräsentierte Gruppen (AA: Aminosäuremetabolismus, SM: Sekundärmetabolismus, HM: Hormonmetabolismus, misc: diverse Funktionen) innerhalb der induzierten und reprimierten Genen von mindestens einem Vergleich. Überrepräsentierte Gengruppen innerhalb eines Ökotyps (in Col-0 responsive Gene: weiße Balken; in Bur-0 responsive Gene: schwarze Balken; in Col-0 und Bur-0 responsive Gene: graue Balken) sind repräsentiert durch signifikant ( $p < 0.05$ : \*) höhere Balken im Vergleich zum Anteil der jeweiligen Gruppe an der Gesamtzahl der Gene im *A. thaliana*-Genom (schwarze Balken). Unterrepräsentierte Gengruppen innerhalb eines Ökotyps und einer Regulation sind repräsentiert durch signifikant ( $p < 0.05$ : \*) niedrigere Balken im Vergleich zu allen exprimierten Genen (schwarze Balken). Statistische Analyse: Fischer Test mit Bonferronikorrektur für multiple Tests.

Generell wurde eine Überrepräsentation für die BIN Gruppe der Stressantwort, unter in Bur-0 und Col-0 induzierten Genen, ermittelt (neben Genen unbestimmter Funktion: misc.). Unter den in Bur-0 spezifisch stärker exprimierten, waren Gene mit Funktion im Aminosäuremetabolismus (AAM), Hormonmetabolismus (HM), in der Stressantwort, der Signalübertragung und des Transportes überrepräsentiert. Unter den in Col-0 spezifisch induzierten Genen fanden sich ebenfalls überrepräsentativ viele Stressantwortgene sowie Gene der Proteinsynthese, des -abbaus und der -modifikation. (Nähere Infos über die BIN und subBIN Struktur unter Thimm *et al.* 2004 [148].)

Bei der Analyse der durch Cd-Stress reprimierten Gene ergab sich eine Überrepräsentation der BIN Gruppe Zellwand. Für die Gruppe des Sekundärmetabolismus zeigten sich dagegen Unterschiede für die Ökotypen. In Bur-0 waren Gene dieser BINs überrepräsentiert, in Col-0 dagegen unterrepräsentiert.

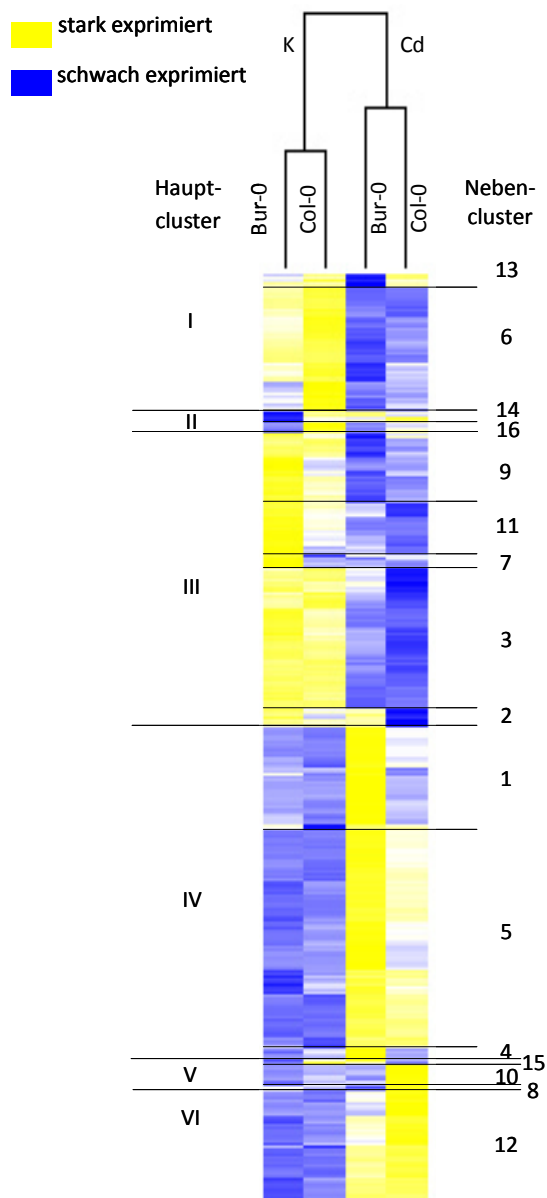
Es zeigte sich, dass bei der generellen Antwort auf Cd-Stress, d. h. der zwischen den beiden Ökotypen vergleichbaren Expressionsänderung, Gene der Stressantwort statistisch häufiger als Gene anderer funktioneller Gruppen induziert wurden. Weniger stark exprimiert wurden dagegen Gene, welche Relevanz für die Zellwand haben (Struktur, Aufbau, Remodellierung). Diese wurden statistisch gesehen stärker und häufiger in der Expression reduziert als Gene anderer Gruppen. Daneben gehören viele Gene (10 bis 16 %), welche in Bur-0 und/oder Col-0 Cd-responsiv waren, zur BIN Klasse der keine konkrete Funktion zugeordnet ist. Dies entsprach einer Anreicherung unter den Cd-responsiven Genen in Bur-0 und Col-0 im Vergleich zum Vorkommen dieser Gene im gesamten Genom (6 %, vgl. schwarzer Balken Abb. 28 B). Eine Aufklärung bzw. eine genauere Betrachtung der Funktion dieser Gene ließe eine eindeutigere Analyse der generellen Cd-Stressantwort in *A. thaliana* zu.

Deutliche Unterschiede in der Strategie der beiden Ökotypen auf Cd-Stress zu reagieren, zeigten sich in unter den durch Cd weniger stark exprimierten Genen des Sekundärstoffwechsels. Bur-0 investierte weniger in den Sekundärstoffwechsel, indem es überrepräsentativ viele Gene in der Expression verringerte. Dagegen wurde die Signalübertragung in Bur-0 stark induziert.

Auch Transporter wurden in beiden Ökotypen (sowohl Gene responsiv in beiden Ökotypen, als auch Ökotyp-spezifische Gene) in ihrer Regulation verändert. Wie an den geringen Unterschieden im Genanteil zu erkennen war, schienen sich Bur-0 und Col-0 hier jedoch kaum zu unterscheiden und es ließ sich nur für in Bur-0 induzierte Gene eine signifikante Überrepräsentation detektieren.

In der zweiten genomweiten Auswertung der 2651 Gene, welche durch Cd-Stress mindestens 2fach in ihrer Expression verändert wurden, wurde mit R zunächst eine Clusteranalyse durchgeführt. Die Gene wurden in 6 Hauptcluster und 16 Nebencluster eingeteilt. Neben der Kennzeichnung der Cluster in Abb. 29 ist in Tab. 9 schematisch die Responsivität der Gene in den jeweiligen Haupt- und Nebenclustern dargestellt.





**Abb. 29:** Graphische Darstellung der Clusteranalyse (Hierarchisches Clustering) der 2651 mindestens 2fach durch Cd in ihrer Expression veränderten Gene. Es wurden aufgrund der Clusteranalyse 6 Hauptcluster und 16 Nebencluster definiert. In Gelb ist eine starke Genexpression, in Blau eine schwache Genexpression dargestellt.

Hauptcluster I und III enthielt Gene, welche in Bur-0 und Col-0 durch Cd-Behandlung reprimiert wurden. In Cluster I waren sie unter Cd-Stress in Bur-0 schwächer exprimiert als in Col-0, in Cluster III stärker. Hauptcluster II enthielt Gene, welche in Bur-0 induziert und in Col-0 durch Cd reprimiert wurden und in Bur-0 schwächer unter Cd-Stress exprimiert wurden als in Col-0. Auch in Cluster V waren Gene enthalten, welche in Col-0 reprimiert und in Bur-0 induziert wurden. Diese wurden jedoch gleichzeitig stärker in Bur-0 exprimiert. In Cluster IV und VI waren Gene vertreten die in beiden Ökotypen induziert wurden. Sie unterschieden sich jedoch in der Stärke der Expression nach Cd-Behandlung in den Ökotypen. So enthielt Cluster IV Gene welche in Bur-0 stärker exprimiert wurden, Cluster VI

diejenigen die in Bur-0 schwächer exprimiert wurden. Gene der Hauptcluster I und III zeigten eine in Bur-0 und Col-0 ähnliche Cd-Responsivität, wie auch Gene der Hauptcluster IV und VI oder II und V.

**Tab. 9:** Schematische Darstellung des Expressionsverhalten der Gene in den Hauptclustern **(A)** und Nebenclustern **(B)** Eine Repression unter Cd bzw. in Bur-0 ist in Blau (-) gekennzeichnet, eine Induktion in gelb (+). Grundlage für die Darstellung ist die mittlere Expressionsänderung aller Gene des Clusters. Als reprimiert gelten Cluster mit einer mittleren Expressionsänderung kleiner 1, als induziert mit größer 1. (Abs. Werte siehe Anhang Tab. 2) Einzelne Gene im Cluster können eine abweichende Regulation aufweisen. Die Clustergröße ist als Genanzahl angegeben.

**A**

Haupt-cluster	Cd-Resp. in Bur-0	Cd-Resp. in Col-0	Bur-0/Col-0 unter Cd-Stress	Anzahl der Gene
I	-	-	-	374
II	+	-	-	59
III	-	-	+	812
IV	+	+	+	887
V	+	-	+	44
VI	+	+	-	383

**B**

Neben-cluster	Cd-Resp. in Bur-0	Cd-Resp. in Col-0	Bur-0/Col-0 unter Cd-Stress	Anzahl der Gene
6	-	-	-	350
13	-	-	-	24
14	+	+	+	27
16	+	-	-	32
2	-	-	+	53
3	-	-	+	389
7	-	+	+	38
9	-	-	-	187
11	-	-	+	145
1	+	+	+	278
5	+	+	+	609
15	+	-	+	7
4	+	-	+	37
8	-	+	-	11
10	+	+	-	64
12	+	+	-	308

Nach der Einteilung in Hauptcluster wurde eine Clusteranalyse zur Definition kleinerer Gensets in 16 Nebencuster durchgeführt (Abb. 29, Tab. 9 B). Somit sollten Gengruppen klarer definiert werden, welche den Unterschied in der Cd-Antwort der Ökotypen repräsentieren. Hauptcluster I wurde dadurch in die Nebencuster 13 und 6 aufgeteilt, Cluster 14 und 18 bildeten zusammen Hauptcluster II und die Cluster 9, 11, 7, 3 und 2 umfassten Hauptcluster III. Hauptcluster IV wurde aufgeteilt in die Cluster 1, 5 und 4. Dagegen wurde Hauptcluster V nicht weiter unterteilt. Es entsprach in dieser Analyse Cluster 15. Die Cluster 10, 8 und 12 wurden aus dem Hauptcluster IV abgeleitet. Besonders

interessant von diesen waren die Cluster 15 und 4, 8, 14 sowie 7. Sie repräsentierten eine kleine Anzahl eng definierter Gene, welche ein unterschiedliches Expressionsverhalten in den beiden Ökotypen aufwiesen. Cluster 15 und 4 bestanden aus Genen, welche in Bur-0 induziert und in Col-0 reprimiert waren. Dem entgegen stand Cluster 8, welches Gene enthielt, die in Col-0 durch Cd-Stress induziert und in Bur-0 reprimiert wurden. In dem Nebenccluster 14 waren Gene vertreten, die in Bur-0 induziert, in Cluster 7 Gene die reprimiert wurden, in Col-0 jedoch nicht responsiv waren. In Tab. 10 sind Gene der jeweils stärksten Induktion oder Repression aufgelistet.

**Tab. 10:** Genen mit der jeweils höchsten Induktion/Repression in Bur-0 bzw. Col-0 unter den durch die Clusteranalyse definierten Gengruppen.

	Bur-0				Col-0			
	induziert		reprimiert		induziert		reprimiert	
	AGI	xfach	AGI	xfach	AGI	xfach	AGI	xfach
<b>Hauptcluster</b>								
I	-	-	AT2G33790: pollen Ole e 1 allergen protein containing 14.6% proline residues	30.0	-	-	AT1G65310: putative xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (expressed in mature, basal regions of main and lateral roots, not in tip where cell division occurs)	12.1
II	AT1G53990: Contains lipase signature motif and GDSL domain.	4.7	AT3G29410: terpene synthase/cyclase family protein	3.1	-	-	AT2G25450: encodes a protein whose sequence is similar to ACC oxidase	4.8
III	-	-	AT5G06900: member of CYP93D	31.9	AT1G10070: Encodes a chloroplast branched-chain amino acid aminotransferase	2.6	AT2G42250: member of CYP712A	34.6
IV	AT4G33710: pathogenesis-related protein	388.4	-	-	AT4G33710: pathogenesis-related protein	191.0	-	-
V	AT1G21120: putative O-Methyltransferase	9.6	-	-	-	-	AT4G36670: putativer Mannitoltransporter	3.9
VI	AT1G64160: disease resistance-responsive family protein	197.2	AT5G22410: peroxidase, putative	3.6	AT1G23730: carbonic anhydrase, putative	70.5	-	-
<b>Nebenccluster</b>								
4 + 15	At1g21120: O-methyltransferase, putative	9.5	-	-	-	-	At4g36670: Major facilitator superfamily protein, putative mannitol transporter	4.06
8	-	-	AT2G26040: Bet v I allergen family protein	2.37	At3g25820, At3g25830: monoterpene 1,8-cineole synthase	4.767	-	-
14	AT3G44720: prephenate dehydratase family protein	3.139	-	-	-	-	-	-
7	-	-	At4g03060: 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (catalyzes the conversion of methylsulfinylalkyl glucosinolates to alkenyl glucosinolates)	10.8	At1g10070: BCAT-2: chloroplast branched-chain amino acid aminotransferase	2.591	At2g26710: CYP734A1: member of the cytochrome p450 family (control point between multiple photoreceptor systems and brassinosteroid signal transduction)	2.23

Die stärkste Induktion wies das Gen At4G33710 in Bur-0 in Cluster 4 auf. Für dieses *pathogenesis-related protein* konnte nach Cd-Behandlung eine um mehrere hundertfach erhöhte Expressionstärke gemessen werden. Auch in Col-0 war es das am stärksten induzierte Gen (190fach). At4G33710 ist bisher nicht näher charakterisiert. Es ist annotiert als *CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein*. Unter den am stärksten reprimierten Genen fanden sich in beiden Ökotypen Mitglieder der Cytochrom P450 Genfamilie. Diese 246 Gene umfassende Familie hat diverse Funktionen in der Synthese von Lignin, Pigmenten, Fettsäuren, Signalmolekülen und „*Defense Compounds*“, welche Pflanzen zur Abwehr von Fraßfeinden produzieren [150].

Von den durch die Clusteranalyse definierten Gengruppen wurden GO-Analysen (*Gene Ontology* Analysen) durchgeführt. Die Beschreibung der GO-Klassen wurde im Original angegeben, da Übersetzungen zu inhaltlichen Ungenauigkeiten führen (GO Annotierung nach Antonov *et al.* 2008 [149]).

In Tab. 11 sind die funktionellen Gruppen aufgelistet, welche unter Genen überrepräsentiert waren, die in Bur-0 und Col-0 durch Cd reprimiert wurden und in Bur-0 unter Cd-Stress weniger stark exprimiert waren (Hauptcluster I). Am höchsten signifikant war die Überrepräsentation des Glukosinolat Biosyntheseprozesses. Diese GO Klasse war nur in diesem Cluster überrepräsentiert (#). Auch hoch signifikant überrepräsentiert und nur in diese Gruppe angereichert waren Gene der GO Klasse der „*cellulose and pectin-containing cell wall loosening*“, d. h., eine Restrukturierung der Zellwand als Reaktion auf Cd-Stress betraf eine Verringerung der Expression von verantwortlichen Genen. Auffällig waren auch die GO Klassen „*anchored to membrane*“ und „*oxygen binding*“. Diese GO Klassen waren in beiden Clustern (I und III) überrepräsentierten, in welchen Cd-reprimierte Gene vertreten sind (\*\*).

In Cluster II, welches Gene umfasst die in Bur-0 and Col-0 differenziell reguliert wurden, und die damit eine ökotypspezifische Betrachtung der Cd-Antwort ermöglichen, ist nur die funktionelle GO Klasse „*cellular\_component*“ überrepräsentiert (Tab. 12). 15 der 59 Gene aus Cluster II wurden dieser GO Klasse zugeordnet. Dies entsprach einer Anreicherung von 26 %. Zu 27 % aller exprimierter Gene ist die GO Klasse „*cellular\_component*“ zugeordnet. Mit dieser Referenzgruppe wurde in der Repräsentationsanalyse die Anreicherung in Cluster II verglichen.

**Tab. 11:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster I, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion, CC: Zelluläres Kompartiment, # GO Klasse nur in diesem Cluster überrepräsentiert, \*\* GO Klasse auch in Cluster III überrepräsentiert. <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe ins. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

Hauptcluster I						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
7.8E-09	7	14	GO:0019761	1.89%	0.05%	# glucosinolate biosynthetic process(BP)
3.0E-07	7	27	GO:0009828	1.89%	0.10%	# cellulose and pectin-containing cell wall loosening(BP)
1.1E-06	7	34	GO:0016798	1.89%	0.13%	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds(MF)
2.4E-09	18	212	GO:0009505	4.86%	0.79%	# cellulose and pectin-containing cell wall(CC)
2.4E-07	10	76	GO:0009826	2.70%	0.28%	# unidimensional cell growth(BP)
5.6E-06	6	28	GO:0000786	1.62%	0.10%	# nucleosome(CC)
1.8E-05	5	20	GO:0009831	1.35%	0.07%	# cellulose and pectin-containing cell wall modification during multidimensional cell growth(BP)
3.8E-06	14	223	GO:0031225	3.78%	0.83%	** anchored to membrane(CC)
5.0E-05	8	90	GO:0005507	2.16%	0.34%	# copper ion binding(MF)
6.1E-05	9	121	GO:0007169	2.43%	0.45%	# transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway(BP)
6.1E-05	12	219	GO:0019825	3.24%	0.82%	** oxygen binding(MF)
2.6E-07	67	2868	GO:0012505	18.11%	10.69%	# endomembrane system(CC)
1.1E-04	6	51	GO:0016829	1.62%	0.19%	# lyase activity(MF)
7.5E-05	8	96	GO:0008289	2.16%	0.36%	# lipid binding(MF)
1.9E-04	10	176	GO:0004674	2.70%	0.66%	# protein serine/threonine kinase activity(MF)
2.2E-04	10	180	GO:0005618	2.70%	0.67%	cell wall(CC)
6.0E-04	9	170	GO:0048046	2.43%	0.63%	# apoplast(CC)
1.6E-03	5	60	GO:0005576	1.35%	0.22%	# extracellular region(CC)

Die GO Klasse war im Cluster II demnach kaum anders vertreten als unter allen in *A. thaliana* exprimierten Genen. In der GO Hierarchie ist „cellular\_component“ eine der drei Übergruppen. Diese Anreicherung enthielt ließ keine Rückschlüsse auf wichtige Funktionen innerhalb dieses Hauptclusters zu.

**Tab. 12:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster II, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. CC: Zelluläres Kompartiment, # GO Klasse nur in diesem Cluster überrepräsentiert, <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe ins. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

Hauptcluster II						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
8.4E-02	15	7483	GO:0005575	26.32%	27.57%	# cellular_component(CC)

In Cluster III, welches Gene umfasst die in beiden Ökotypen Cd-reprimiert waren, waren Gene überrepräsentiert die der GO Klasse „cellulose and pectin-containing cell wall organization and biogenesis“ zugeordnet werden (Tab. 13, vgl. 11). Diese GO Klasse wurde spezifische in Cluster III detektiert, sie ist jedoch in der GO Hierarchie mit der Gruppe „cellulose and pectin-containing cell wall loosening“ verwandt. So bestätigte sich erneut die generelle Cd-Stressantwort, bei der die Zellwandstruktur durch Reduktion der Expression von strukturmodifizierenden wirkenden Genen verändert wird. Höchst signifikant und spezifisch für Cluster III war auch die Anreicherung der GO Klasse „water channel activity“.

**Tab. 13:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster III, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion, CC: Zelluläres Kompartiment, # GO Gruppe nur in diesem Cluster überrepräsentiert, \*\* GO Klasse auch in Cluster I überrepräsentiert. <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe ins. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

Hauptcluster III						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
4.1E-08	9	18	GO:0009664	1.13%	0.07%	# cellulose and pectin-containing cell wall organization and biogenesis(BP)
1.2E-11	30	207	GO:0031225	3.77%	0.78%	** anchored to membrane(CC)
8.1E-07	9	28	GO:0015250	1.13%	0.11%	# water channel activity(MF)
4.9E-07	10	35	GO:0015979	1.26%	0.13%	# photosynthesis(BP)
1.0E-06	9	29	GO:0005199	1.13%	0.11%	# structural constituent of cell wall(MF)
2.0E-06	9	32	GO:0016798	1.13%	0.12%	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds(MF)
4.5E-07	13	67	GO:0004601	1.63%	0.25%	peroxidase activity(MF)
4.5E-07	21	183	GO:0006979	2.64%	0.69%	response to oxidative stress(BP)
1.9E-09	72	1158	GO:0016020	9.05%	4.39%	# membrane(CC)

Fortsetzung von Tab. 13

4.1E-06	62	1179	GO:0005886	7.79%	4.46%		plasma membrane(CC)
2.7E-05	8	35	GO:0009735	1.01%	0.13%	#	response to cytokinin stimulus(BP)
3.7E-05	14	123	GO:0022626	1.76%	0.47%	#	NA
2.0E-04	23	335	GO:0003735	2.89%	1.27%	#	structural constituent of ribosome(MF)
8.9E-05	11	85	GO:0006950	1.38%	0.32%	#	response to stress(BP)
4.8E-05	17	180	GO:0009409	2.14%	0.68%	#	response to cold(BP)
2.1E-04	5	15	GO:0009631	0.63%	0.06%	#	cold acclimation(BP)
2.1E-04	5	15	GO:0030076	0.63%	0.06%	#	light-harvesting complex(CC)
1.0E-04	18	213	GO:0019825	2.26%	0.81%	**	oxygen binding(MF)
1.8E-04	6	24	GO:0005200	0.75%	0.09%	#	structural constituent of cytoskeleton(MF)
4.2E-04	5	18	GO:0016071	0.63%	0.07%	#	mRNA metabolic process(BP)
1.8E-04	11	93	GO:0042254	1.38%	0.35%	#	ribosome biogenesis and assembly(BP)
3.2E-04	15	175	GO:0005618	1.88%	0.66%		cell wall(CC)
4.1E-04	12	122	GO:0009414	1.51%	0.46%	#	response to water deprivation(BP)
4.2E-04	18	243	GO:0009535	2.26%	0.92%	#	chloroplast thylakoid membrane(CC)
4.4E-04	19	266	GO:0006810	2.39%	1.01%	#	transport(BP)
7.5E-04	10	95	GO:0022627	1.26%	0.36%	#	NA
5.7E-04	6	31	GO:0000156	0.75%	0.12%	#	two-component response regulator activity(MF)
2.0E-03	24	435	GO:0005737	3.02%	1.65%	#	cytoplasm(CC)

In Cluster IV fanden sich Gene, welche generell Cd-induziert waren. Unter diesen sind GO Klassen wie „*response to chitin*“, „*defense response to fungus*“ oder „*response to wounding*“ überrepräsentiert (Tab. 14). Diese könnten auch unter dem Überbegriff der Stressantwort zusammengefasst werden. Die Cd-Antwort erfolgte demnach durch Induktion von Genen, welche im Zusammenhang mit biotischen Stressfaktoren induziert werden. Eine Überlappung der Antwort auf das nicht-essentielle Schwermetall Cadmium mit anderen Stressantworten schien stattzufinden. Neben Cluster IV spezifischen GO Klassen, waren auch GO Klassen überrepräsentiert, die zudem in Hauptcluster VI auftauchten (\*\*). Beide Cluster beinhalteten Gene, deren Expression durch Cd-Behandlung in beiden Ökotypen induziert war. Somit waren diese GO Klassen von besonderem Interesse, um die generelle Cd-Antwort von *A. thaliana* zu bestimmen. Dazu gehörten „*response to wounding*“ und „*defense response*“, „*transcription factor activity*“ und „*multicellular organism development*“. Bei

diesen handelt es sich um GO Klassen, welche in der Hierarchie viele, spezifischere Klassen umfassen. Spezifischere GO Klassen, die in Cluster IV und VI angereichert waren, sind „*response to abscisic acid stimulus*“, „*response to jasmonic acid stimulus*“ und „*response to salt stress*“. Gerade letztere Gruppe ist im Hinblick auf eine mögliche Vernetzung der Salz- und Cd-Toleranz interessant. Sie wurde aus 19 Genen gebildet:

- At4g16260 Glycosyl hydrolase superfamily protein
- At1g73500 MKK9: MAP kinase kinase 9
- At1g44170 DH3H1: aldehyde dehydrogenase 3H1
- At1g16540 ABA3: molybdenum cofactor sulfurase (LOS5, SIR3)
- At5g27600 LACS7: long-chain acyl-CoA synthetase 7
- At5g49620 MYB78: myb domain protein 78
- At4g38620 MYB4: myb domain protein 4
- At4g34180 Cyclase family protein
- At1g18570 MYB51: myb domain protein 51
- At3g23250 MYB15: myb domain protein 15
- At3g06490 MYB108: myb domain protein 108
- At1g48000 MYB112: myb domain protein 112
- At1g28380 NSL1: MAC/Perforin domain-containing protein
- At1g27730 ZAT10: salt tolerance zinc finger
- At1g54100 ALDH7B4: aldehyde dehydrogenase 7B4
- At1g22640 MYB3: myb domain protein 3
- At1g27320 AHK3: histidine kinase 3
- At2g38470 WRKY33: WRKY DNA-binding protein 33
- At2g30250 WRKY25: WRKY DNA-binding protein 25

Die meisten dieser Gene sind Transkriptionsfaktoren der MYB und WRKY Klasse. Daneben waren zwei Dehydrogenasen, ein Glycosylhydrolase Superfamilieprotein, eine Sulfurase, welche Molybdän als Co-Faktor verwendet, und eine Histidin und einer MAP Kinase vertreten. Zudem fand sich eine Überrepräsentation in der GO Klasse „*metal ion transport*“. Hier waren 11 Gene im Cluster vertreten, eines davon ohne Tair Annotierung. Die verbleibenden 10 Gene waren:

- At5g52670 Copper transport protein family
- At5g52680 Copper transport protein family
- At5g52710 Copper transport protein family
- At5g52760 Copper transport protein family
- At5g52750 Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
- At5g23760 Copper transport protein family
- At3g07600 Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
- At1g60960 IRT3: iron regulated transporter 3
- At1g55790 Domain of unknown function (DUF2431)
- At2g35730 Heavy metal transport/detoxification superfamily protein



**Tab. 14:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster IV, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion, CC: Zelluläres Kompartiment, # GO Klasse nur in diesem Cluster überrepräsentiert, \*\* GO Klasse auch in Cluster VI überrepräsentiert. <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe ins. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

Hauptcluster IV						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
3.6E-18	30	97	GO:0010200	3.47%	0.37%	# response to chitin(BP)
5.7E-14	18	38	GO:0050832	2.08%	0.14%	# defense response to fungus(BP)
2.3E-18	82	829	GO:0016301	9.48%	3.15%	kinase activity(MF)
2.6E-12	23	96	GO:0009611	2.66%	0.36%	** response to wounding(BP)
1.1E-09	14	41	GO:0051707	1.62%	0.16%	# response to other organism(BP)
7.6E-13	43	347	GO:0006952	4.97%	1.32%	** defense response(BP)
1.3E-08	12	34	GO:0009407	1.39%	0.13%	# toxin catabolic process(BP)
3.2E-09	16	64	GO:0004601	1.85%	0.24%	peroxidase activity(MF)
2.8E-10	27	177	GO:0006979	3.12%	0.67%	response to oxidative stress(BP)
1.6E-06	7	13	GO:0009627	0.81%	0.05%	# systemic acquired resistance(BP)
7.0E-08	12	41	GO:0009617	1.39%	0.16%	# response to bacterium(BP)
1.2E-05	5	6	GO:0031348	0.58%	0.02%	# negative regulation of defense response(BP)
4.1E-08	15	68	GO:0030246	1.73%	0.26%	# carbohydrate binding(MF)
1.1E-07	15	74	GO:0042742	1.73%	0.28%	# defense response to bacterium(BP)
2.9E-06	8	22	GO:0048544	0.92%	0.08%	# recognition or rejection of self pollen(BP)
1.7E-10	60	739	GO:0006468	6.94%	2.81%	protein amino acid phosphorylation(BP)
6.0E-07	22	186	GO:0009737	2.54%	0.71%	** response to abscisic acid stimulus(BP)
2.1E-06	48	721	GO:0006355	5.55%	2.74%	# regulation of transcription, DNA-dependent(BP)
6.9E-06	81	1596	GO:0003700	9.36%	6.06%	** transcription factor activity(MF)
2.4E-05	63	1178	GO:0005886	7.28%	4.47%	plasma membrane(CC)
8.2E-07	15	89	GO:0046872	1.73%	0.34%	# metal ion binding(MF)
1.2E-06	15	92	GO:0009751	1.73%	0.35%	response to salicylic acid stimulus(BP)
8.6E-06	13	83	GO:0009723	1.50%	0.32%	# response to ethylene stimulus(BP)
7.2E-06	14	95	GO:0009408	1.62%	0.36%	# response to heat(BP)

Fortsetzung von Tab. 14

2.0E-05	13	91	GO:0042626	1.50%	0.35%	#	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances(MF)
1.9E-05	14	105	GO:0009753	1.62%	0.40%	**	response to jasmonic acid stimulus(BP)
4.0E-05	8	34	GO:0004806	0.92%	0.13%	#	triacylglycerol lipase activity(MF)
3.2E-05	11	68	GO:0030001	1.27%	0.26%	#	metal ion transport(BP)
3.3E-05	13	96	GO:0031224	1.50%	0.36%	#	intrinsic to membrane(CC)
4.0E-05	18	179	GO:0004553	2.08%	0.68%	#	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds(MF)
7.6E-05	6	18	GO:0009620	0.69%	0.07%	#	response to fungus(BP)
6.9E-05	16	153	GO:0005516	1.85%	0.58%	#	calmodulin binding(MF)
3.8E-04	32	525	GO:0008152	3.70%	1.99%	#	metabolic process(BP)
1.3E-04	14	129	GO:0007275	1.62%	0.49%	**	multicellular organismal development(BP)
9.2E-05	19	211	GO:0009651	2.20%	0.80%	**	response to salt stress(BP)
2.1E-04	10	72	GO:0009055	1.16%	0.27%	#	electron carrier activity(MF)
4.9E-04	5	17	GO:0006874	0.58%	0.06%	#	calcium ion homeostasis(BP)
2.7E-04	8	47	GO:0009624	0.92%	0.18%	#	response to nematode(BP)
2.5E-04	11	89	GO:0008194	1.27%	0.34%	#	UDP-glycosyltransferase activity(MF)
7.1E-04	15	175	GO:0005618	1.73%	0.66%		cell wall(CC)
8.9E-04	5	20	GO:0009816	0.58%	0.08%	#	defense response to bacterium, incompatible interaction(BP)
6.0E-04	8	54	GO:0006855	0.92%	0.20%	#	multidrug transport(BP)
1.0E-03	15	182	GO:0009409	1.73%	0.69%		response to cold(BP)

Sie sind weitestgehend noch uncharakterisiert, werden aber den Kupfertransportern zugeschrieben. Dazu kam das prominente IRT3, ein eisenregulierter Eisentransporter. Hierin könnte ein Hinweis für eine Beeinflussung des Fe-Transportes durch Cd zu finden sein.

Cluster V war mit 44 Genen das kleinste Hauptcluster. Es enthielt Gene die in Bur-0 Cd-induziert und in Col-0 Cd-reprimiert waren. Anders als Cluster II, auf das diese Beschreibung ebenfalls zutrifft, waren die Gene in Cluster V in Bur-0 unter Cd-Stress stärker exprimiert als in Col-0. Hier fand sich eine Anreicherung von zwei GO Klassen „*kinase activity*“ und „*protein amino acid phosphorylation*“. 15 und 11 % der Gene in Cluster V gehören diesen GO Klassen an (Tab. 15). Damit bilden sie einen größeren Anteil als die 3 % aller exprimierter Gene, die

insgesamt den Clustern zugeordnet werden. Anders als bei der Anreicherung der GO Gruppe in Cluster II, bei der mit 26 % kaum ein Unterschied zur GO-Gruppengröße (27 %) bestand, handelte es sich bei der Anreicherung in Cluster V um einen aussagekräftigen Unterschied. Demnach informiert diese Überrepräsentation der beiden GO Klassen in Cluster V über Funktionen, die unter Cd- induzierten Genen in Bur-0 relevant sind.

**Tab. 15:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster V, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion, <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe insg. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

<b>Hauptcluster V</b>						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
4.2E-04	7	904	GO:0016301	15.91%	3.33%	kinase activity(MF)
6.6E-03	5	794	GO:0006468	11.36%	2.92%	protein amino acid phosphorylation(BP)

Im Cluster VI sind Gene vertreten welche in beiden Ökotypen Cd-induziert waren. Dieses Expressionsverhalten kann mit dem der Gene in Cluster IV verglichen werden. Hier enthaltene Gene wiesen jedoch eine geringere Expression in Bur-0 unter Cd-Stress auf. Die Ähnlichkeit in der Expression hat auch eine hohe Ähnlichkeit in der Detektion von überrepräsentierten GO Klassen zur Folge. Unter den 9 detektierten GO Klassen wurden 7 auch in Cluster IV als überrepräsentiert ermittelt. Daneben ist die Klasse „*transmembrane receptor activity*“ nur unter Genen des Clusters VI überrepräsentiert (Tab. 16).

**Tab. 16:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Hauptcluster VI, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion, # GO Klasse nur in diesem Cluster überrepräsentiert, \*\* GO Klasse auch in Cluster IV überrepräsentiert. <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe insg. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

<b>Hauptcluster VI</b>						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
1.0E-09	14	105	GO:0009611	3.72%	0.39%	** response to wounding(BP)
1.9E-05	6	35	GO:0016798	1.60%	0.13%	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds(MF)
3.5E-05	9	110	GO:0009753	2.39%	0.41%	** response to jasmonic acid stimulus(BP)
4.5E-05	41	1636	GO:0003700	10.90%	6.10%	** transcription factor activity(MF)

Fortsetzung von Tab. 16

1.0E-04	8	99	GO:0009751	2.13%	0.37%	**	response to salicylic acid stimulus(BP)
1.2E-04	11	197	GO:0009737	2.93%	0.73%	**	response to abscisic acid stimulus(BP)
6.9E-04	14	376	GO:0006952	3.72%	1.40%	**	defense response(BP)
6.7E-04	8	135	GO:0007275	2.13%	0.50%	**	multicellular organismal development(BP)
1.2E-03	7	114	GO:0004888	1.86%	0.43%	#	transmembrane receptor activity(MF)

Unter den detaillierteren Nebenclustern (Tab. 9 B) fanden sich Überrepräsentationen von GO Klassen nur in den Clustern 4 und 15 (Tab. 17). Beide definieren Gene, die in Bur-0 induziert und in Col-0 reprimiert waren. Zudem wiesen diese Gene unter Cd-Stress in Bur-0 eine stärkere Expression auf. Anders als in den Übergruppen (Tab. 9 A, sowie Tab. 11 – 16), in welchen Anreicherungen stets hoch signifikant waren, waren die Überrepräsentationen nur für 9 von 18 GO Klassen signifikant ( $p_{\text{ang.}} < 0.05$ ). Dazu gehörten „*response to oxidative stress*“, „*kinase activity*“ und „*protein amino acid phosphorylation*“. Für die GO Klassen „*molecular\_function*“ und „*biological\_process*“ ist der Anteil an im Cluster vertreten Genen (<sup>1</sup>: Tab. 17) geringer als der Anteil von Genen der Klasse insgesamt (<sup>2</sup>: Tab. 17).

**Tab. 17:** Überrepräsentierte Gene Ontologien für Gene der Cluster 4 und 15, errechnet aus der Clusteranalyse (vgl. Abb. 29, Tab. 9 B).  $p_{\text{angepasst}}$  gibt die Signifikanz der Anreicherung an. Berechnungen und Selektion, der GO Gruppen erfolgte nach [149]. BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion, # GO Klasse nur in diesem Cluster überrepräsentiert, \*\* GO Klasse auch in Cluster 4 überrepräsentiert, <sup>1</sup>: Anz. der Gene der jeweiligen GO Klasse im Cluster / Anz. der Gene in GO Gruppe insg. <sup>2</sup>: Anteil alle exp. Gene die der GO Klasse angehören

Cluster 4 und 15						
$P_{\text{ang.}}$	Anz. Gene im Cluster	Anz. Gene in GO Gruppe insg.	ID	Anteil am ges. Cluster <sup>1</sup>	GO Gruppengröße <sup>2</sup>	GO Gruppe
2.0E-04	2	11	GO:0009266	4.55%	0.04%	response to temperature stimulus(BP)
2.0E-04	2	11	GO:0008113	4.55%	0.04%	protein-methionine-S-oxide reductase activity(MF)
3.0E-04	4	200	GO:0006979	9.09%	0.74%	response to oxidative stress(BP)
4.2E-04	7	904	GO:0016301	15.91%	3.33%	kinase activity(MF)
6.6E-03	5	794	GO:0006468	11.36%	2.92%	protein amino acid phosphorylation(BP)
7.1E-03	2	78	GO:0004601	4.55%	0.29%	peroxidase activity(MF)
8.7E-03	2	87	GO:0015144	4.55%	0.32%	carbohydrate transporter activity(MF)
2.8E-02	5	8010	GO:0003674	11.36%	29.50%	molecular_function(MF)
4.4E-02	7	9593	GO:0008150	15.91%	35.33%	biological_process(BP)

Bei Diesen handelt es sich um 2 der drei großen Überklassen. Sie umfassen alle weiteren, detaillierteren GO Klassen und damit eine große funktionelle Diversität. Eine Überrepräsentation in „*molecular\_function*“, „*biological\_process*“ oder „*cellular\_compartment*“ hat aus diesem Grund keinen hohen Informationsgehalt.

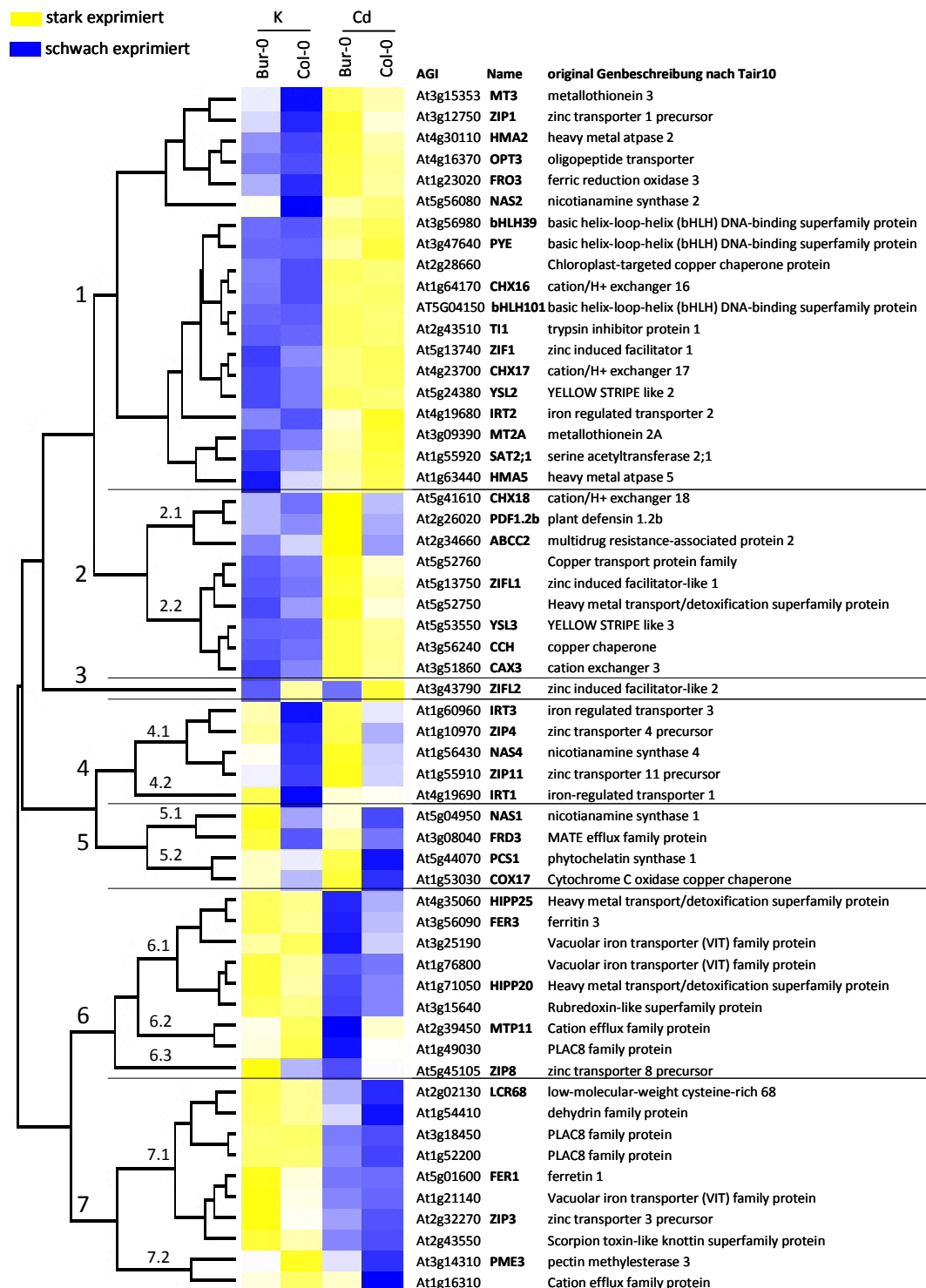
### 2.5.2.3. Cd-Responsivität bekannter Schwermetallgene in Bur-0 und Col-0

Natürlich ist die Regulation von Genen von gesondertem Interesse, für die ein Zusammenhang mit der Schwermetallhomöostase bekannt ist. Gene der funktionellen Gruppe des Metall-*Handlings* sind zu 0.29 % unter den insgesamt Exprimierten vertreten. In Bur-0 waren Metall-*Handling* Gene zu 1.12 % unter den Cd-induzierten und zu 2 % unter den Cd-reprimierten Genen vertreten. In Col-0 waren es 0.99 % der Induzierten und 3.87 % der Reprimierten. Gene die in beiden Ökotypen gleichermaßen durch Cd beeinflusst wurden, waren zu 0.88 % (induzierte Gene) und 0.44 % (reprimierte Gene) in der Gruppe der Metall-*Handling* Gene vertreten.

Um die Expressionsveränderung der einzelnen Metallhomöostasegene zu betrachten, wurde eine Clusteranalyse dieser Gene mit R durchgeführt (Abb. 30). Die Auswahl der 57 Gene erfolgte aus einem Set von 243. Diese umfassen alle Gene welche in Zusammenhang mit Schwermetallaufnahme, -transport, -lagerung und -toleranz gesehen werden (pers. Kommunikation, Singh *et al.*). Es wurden diejenigen für die Clusteranalyse ausgewählt, welche eine mindestens 2fache Induktion oder Repression in einem oder beiden Ökotypen zeigten oder sich nach der Cd-Behandlung in den beiden Ökotypen mindestens 2fach in ihrer Expression unterschieden.

Durch die Clusteranalyse zeigten sich Gruppen mit unterschiedlicher Regulation in den beiden Ökotypen. Zum Beispiel war die Expression von Genen in Cluster 2.1 ausschließlich in Bur-0 Cd-induziert. Dazu gehörte *ABCC2*. Dieses codiert für einen PC-Metall-Komplex Transporter welcher, zusammen mit seinem homologen *ABCC1*, für die Toleranz gegenüber PC-komplexierten Schwermetallionen wichtig ist [98, 100, 101]. In Cluster 4.1 lag das *NAS4* Gen. Induziert wurden Gene dieses Clusters in beiden Ökotypen, in Bur-0 erreichten sie jedoch unter beiden Bedingungen wesentlich höhere Expressionslevel. Durch NAS (Nicotianaminsynthase) wird die Bildung eines Zn/Cu und Mn bindenden Polyamin (Nicotianamin) katalysiert. Eine weitere Isoform ist das in Cluster 5.1 liegende Gen *NAS1*.

Auch *NAS1* wurde in Bur-0 stärker exprimiert als in Col-0, es war nach Cd-Behandlung jedoch eine leichte Repression erkennbar.



**Abb. 30:** Hierarchische Clusteranalyse der Metallhomöostasegene zeigt Gruppen unterschiedlicher Cd-Responsivität. Das Clustering erfolgte mit R Vers. 3.1.0 basierend auf RMA normalisierten log. Expressionsleveln. Unter 243 Metallhomöostasegenen (Singh *et al.* pers. Kommunikation) wurden diejenigen mit mindestens 2fach veränderter Expression nach Cd-Behandlung oder mindestens 2fach unterschiedlicher Expression zwischen Bur-0 und Col-0 unter Cd-Behandlung für die Analyse ausgewählt.

NAS1 ist für den Langstreckentransport der Metalle relevant [113]. Im Cluster 4.2 ist nur ein Metallhomöostasegen vertreten. *IRT1* erreichte in beiden Ökotypen nach Cd-Behandlung dasselbe Expressionslevel, nachdem es in Bur-0 unter Kontrollbedingungen deutlich stärker exprimiert wurde als in Col-0. In Bur-0 wurde das Gen durch die Cd-Behandlung reprimiert, in Col-0 dagegen induziert. *IRT1* ist ein Fe-responsiver Fe-Transporter, für den im Laufe der Zeit auch andere Substrate, nämlich  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , identifiziert werden konnten [59]. In Cluster 5.1 enthaltene Gene zeigten eine Repression in Col-0. Dazu gehörte das Gen *PCS1*, dessen Produkt für die metallinduzierte PC Produktion verantwortlich ist [78]. Auch Cluster 6.3 enthielt nur ein Gen. Dieses war in Bur-0 stark Cd-reprimiert und in Col-0 Cd-induziert und erreichte dabei auch höhere Expressionslevel in Col-0 nach Cd-Behandlung als in Bur-0. Das Gen *ZIP8* gehört zu den ZIP Transportern. In früheren Expressionsanalysen konnte für *ZIP8* auch nach Behandlung mit hohen Zn-Konzentrationen und unter Fe-Mangel in Col-0 eine Induktion festgestellt werden [151]. ZIP Transporter sind relevant für die Aufnahme von essenziellen Schwermetallen wie  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$  [152]. Das letzte Cluster mit Genen mit deutlich unterschiedlicher Regulation in Bur-0 und Col-0 ist 7.2. Hierin enthalten ist z.B. *PME3*. Dieses Zellwandstruktur beeinflussende Gen, für welches auch eine Rolle in der Zn-Toleranz bekannt ist [114], war in Bur-0 nicht Cd-responsiv und wurde in Col-0 reprimiert.

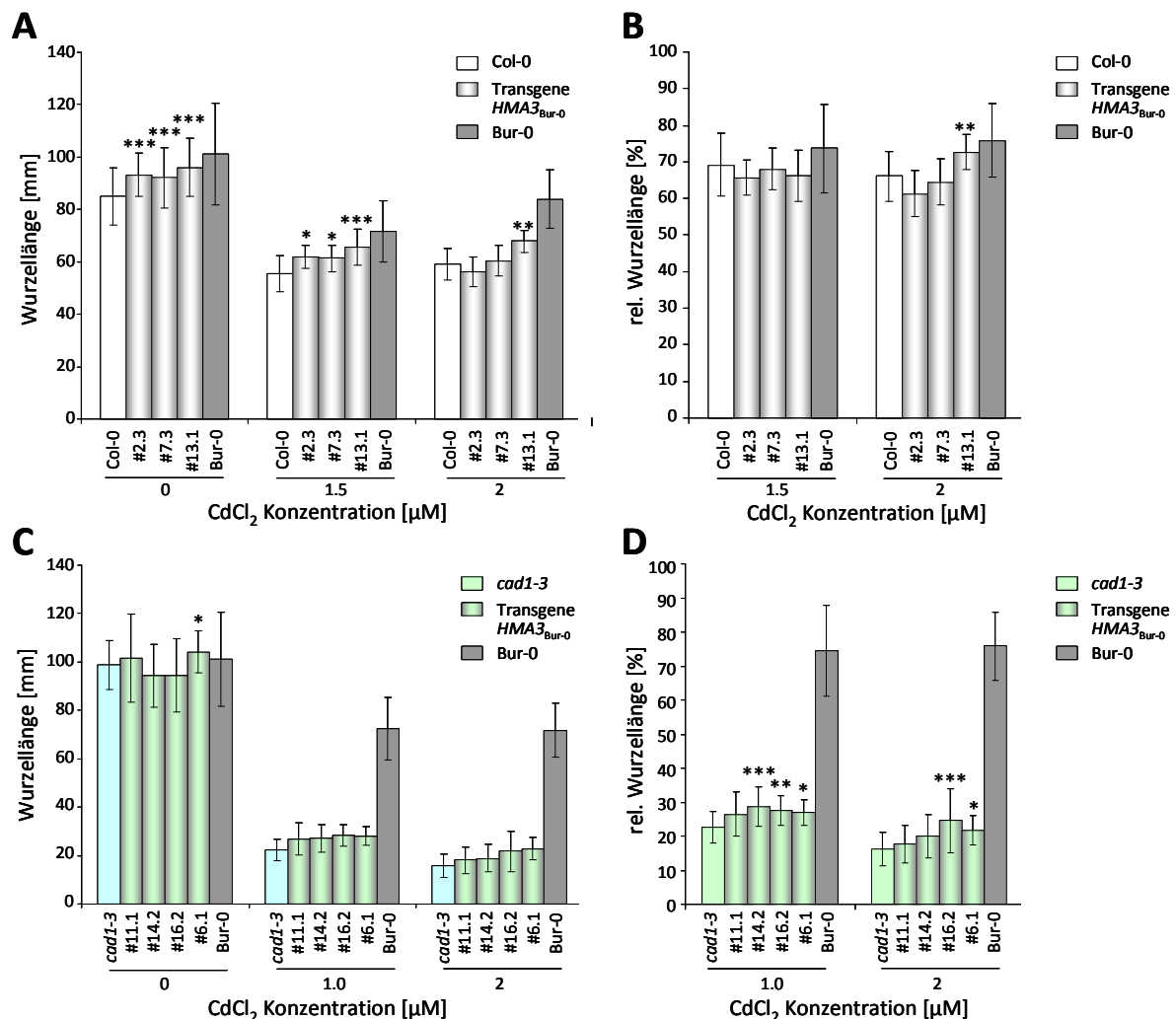
### 2.6. Das Kandidatengen HMA3

Das aufgrund von 3 Parametern (I: bekannter Cd-Transporter, II: Nähe zum höchsten LOD Wert, III: Sequenzunterschiede mit Effekt auf die Funktion) als Kandidatengen identifizierte *HMA3*<sub>Bur-0</sub> wurde inklusive der umgebenden genomischen Region in Col-0 transferiert um den Effekt von *HMA3*<sub>Bur-0</sub> auf die Cd-Toleranz diese Ökotyps zu ermitteln. Da anzunehmen war, dass *HMA3* in diesem Kontext nur einen geringen Beitrag zur Toleranz von Bur-0 leistet (12.5 % eines im Mittel 25 %igen Wachstumsunterschiedes), wurde das Gen außerdem in die Mutante *cad1-3* transferiert. In dieser ist, durch Mutagenisierung des Gens *AtPCS1*, die Phytochelatinsynthese stark reduziert [80, 82, 83, 115]. Der genetische Hintergrund dieser Mutante ist Col-0. Phytochelatine tragen zu einem großen Teil zur Cd-Toleranz bei [79, 115]. Der Toleranzunterschied zwischen *cad1-3* und Bur-0 ist aus diesem Grund deutlich größer als

der von Col-0 und Bur-0. So besteht die Möglichkeit den geringen Beitrag von HMA3<sub>Bur-0</sub>, welcher laut MapQTL5® nur 12.5 % beträgt, besser sichtbar zu machen.

Das Wachstum von 10 HMA3<sub>Bur-0</sub> transgenen Col-0 Linien mit unabhängigen Insertionsereignissen wurden analysiert, dazu 6 unabhängige *cad1-3*-HMA3<sub>Bur-0</sub> Linien. Die Toleranz wurde dabei für transgene Col-0 Linien bei 2 und 1.5 µM CdCl<sub>2</sub> Stress erfasst und für transgene *cad1-3* Linien bei 2 und 1 µM. In Abb. 31 ist das Wachstum der 7 cadmiumtolerantesten transgenen Linien gezeigt.

Unter Mappingbedingungen zeigte Bur-0 ein Wachstum von 75 ± 10 %. Erneut zeigt sich hier der Unterschied in der Toleranz zu Col-0 welche bei 2 µM CdCl<sub>2</sub> nur eine Wurzellänge von 66 ± 6 % erreicht.



**Abb. 31:** Cd-Toleranz von AtHMA3<sub>Bur-0</sub> transgenen Linien. Absolute **(A)** und relative **(B)** Wurzellänge der Ökotypen Col-0 und Bur-0 sowie von Col-0-HMA3<sub>Bur-0</sub> unter Cd-Stress. Absolute **(C)** und relative **(D)** Wurzellänge der AtPCS1 Mutante *cad1-3* und des Ökotyps Bur-0 sowie von *cad1-3*-HMA3<sub>Bur-0</sub> unter Cd-Stress. Dargestellt sind MW ± SD aus 2 unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zum Wachstum der nicht transformierten Pflanze wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse und Tukey Test ermittelt, n = 14-104. \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001.



Die transgenen Col-0 Linien (Abb. 31 A, B) zeigten nach zwei unabhängigen Versuchen ein mittleres Wachstum von  $61 \pm 6 \%$  bis  $72 \pm 4 \%$ . Damit wurde unter Mappingbedingungen nur für eine Linie (#13.1) eine partielle, Komplementation des Col-0 Phänotyps erreicht (Abb. 31 B). Ein Positionseffekt des Transgens kann hier nicht ausgeschlossen werden. Unter der zweiten Bedingung konnten keine signifikanten Unterschiede im relativen Wurzelwachstum zwischen Col-0 und den daraus hervorgegangenen *HMA3*<sub>Bur-0</sub> transgenen Linien festgestellt werden. Absolute Wurzellängen zeigten unter diesen Bedingungen zwar ein besseres Wachstum für alle getesteten transgenen Col-0 Linien, da diese Unterschiede jedoch auch unter Kontrollbedingungen vermerkt wurden war in diesem Fall nur das relative Wachstum aussagekräftig für die Cd-Toleranz (Abb. 31 A). Die Transformation von *cad1-3* erzeugte *HMA3*<sub>Bur-0</sub> transgene *cad1-3* Linien, von welchen 2 im Vergleich zur Mutante *cad1-3* unter beiden getesteten Bedingungen ein signifikant besseres Wachstum aufwiesen. Bei einem CdCl<sub>2</sub> Stress von 1  $\mu\text{M}$  zeigten sie ein rel. Wurzelwachstum von  $27 \pm 4 \%$ , dagegen wies *cad1-3* nur ein Wachstum von  $22 \pm 4 \%$  auf. Bei 2  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> verschärfte sich der Unterschied. *cad1-3* liegt dabei bei  $16 \pm 4 \%$ , die beiden Transgenen Linien bei  $21 \pm 4 \%$  bzw.  $24 \pm 9 \%$ .

Die Cd-Toleranz von Col-0 wurde durch eine funktionale Kopie des Gens *HMA3* aus dem Ökotyp Bur-0 nur marginal verbessert. Diese geringen Wachstumsunterschiede waren im vorhandenen System schwer aufzuklären, auch wenn sie bei längerem Wachstum, zum Beispiel auf Cd-belasteten Böden, zur Verbesserung der Fitness führen könnten. Die Transformation der Cd-sensitiveren Mutante *cad1-3* wies jedoch darauf hin, dass *HMA3* in Bur-0 für die erhöhte Cd-Toleranz mitverantwortlich ist.

### **3. Diskussion**

In diesem Projekt wurde die Cd-Toleranz von Bur-0, einem irischen *A. thaliana* Ökotyp, untersucht. Bur-0 zeigte ein 30 % besseres rel. Wurzelwachstum als der Referenzökotyp Col-0. Auch das Keimlingsgewicht von Bur-0 war unter Cd-Stress höher als das von Col-0. Unter 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  wurden die größten Unterschiede sichtbar. Col-0 erreichte hier nur 30 % des Gewichtes unter Kontrollbedingungen, Bur-0 jedoch mehr als 60 %. Auch für Zn zeigte Bur-0 eine höhere Toleranz als Col-0. Bei 80  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ -Behandlung wurde ein ca. 20 %iger Unterschied in der Wurzellänge und ein 10 %iger Unterschied im Keimlingsgewicht sichtbar. Eine Pearson Korrelation der Zn- und Cd-Toleranz von Bur-0 X Col-0 Nachkommen deutet mit einem Korrelationskoeffizient von 0.711 ( $p = 0.000142$ ) an, dass die beiden Eigenschaften miteinander verknüpft sind. Möglicherweise sind die Gene, die die erhöhte Cd-Toleranz in Bur-0 vermitteln auch für die erhöhte Zn-Toleranz verantwortlich. Die Zn-Toleranz von Bur-0 konnte auch in einem naturnäheren System analysiert werden. Dafür wurde eine mineralische Erde mit  $\text{ZnSO}_4$  kontaminiert und die Blattfläche von darin wachsenden Bur-0 und Col-0 Pflanzen als Indikator der Zn-Toleranz verwendet. Dasselbe System konnte bereits angewandt werden um die Relevanz von Phytochelatinen für die Detoxifikation von Cd unter natürlicheren Bedingungen zu demonstrieren [83]. Bur-0 wies auch unter diesen Bedingungen eine höhere Zn-Toleranz auf.

Eine mögliche Erklärung für die Toleranz ist dabei der geringere Zn-Gehalt im Spross von Bur-0. Da auch der Fe-Gehalt im Vergleich zu Col-0 reduziert war, scheint es in Bur-0 Unterschiede in der Metallaufnahme oder Verteilung zu geben. Ob es sich dabei um eine veränderte Aufnahme oder Translokation von Zn und Fe handelt, und ob auch Cd von dieser Veränderung betroffen ist sollte in einem hydroponischen System erfasst werden, in welchem auch Wurzeln zugänglich sind. Nach 1-wöchigem Cd-Stress konnte dabei eine geringere Cd-, Fe- und Zn-Aufnahme (Metallgehalt der Wurzel) und Translokation (Metallgehalt des Sprosses) beobachtet werden. Da durch einen Zn-Stress im gleichen Zeitrahmen Fe- und Zn-Gehalte nur in den Wurzeln von Bur-0 geringer waren, im Spross jedoch mehr Zn und Fe zu finden war, könnte die Aufnahme von Zn, Fe und Cd in Bur-0 verstärkt durch ähnliche Transporter vermittelt werden. Die Translokation von Zn und Fe

wurde jedoch durch Zn-Stress anders beeinflusst als durch Cd-Stress und erfordert daher scheinbar unterschiedliche Mechanismen.

Ein Beispiel für einen bereits gut charakterisierten Metallaufnahmetransporter ist IRT1. Für diesen konnte eine Aufnahme von Fe, Mn, Zn, Cd und Co *in planta* nachgewiesen werden [60]. Unterschiede in der Funktion von IRT1 in Bur-0 und Col-0 kämen durchaus für eine Erklärung der Unterschiede im Metallgehalt in Frage. Auch ein vakuolärer Transporter kann, indirekt, die Aufnahme von Metallen beeinflussen. AtNRAMP3, remobilisiert Fe-, Mn- und Zn- unter Fe-Mangel aus der Vakuole der Wurzelzellen. Dies ermöglicht eine Translokation der essenziellen Metalle in den Spross auch bei geringer Aufnahme von Fe. Ein Defekt im Transporter führt dagegen zu einer Anreicherung der Metalle in der Wurzel, da diese unter Fe-Mangel nicht mobilisiert werden können und durch eine Induktion der Fe-Aufnahmesysteme unter diesen Bedingungen in höheren Konzentrationen in der Wurzel zu finden sind [110].

Wurden die Pflanzen statt für eine Woche für 3 Wochen mit Cd oder Zn gestresst, waren kaum noch Unterschiede zwischen den Ökotypen erkennbar. Durch Cd-Stress wurde weniger Zn in Bur-0 aufgenommen, jedoch war dies nur unter höheren Cd-Konzentrationen erkennbar. Die Spross-Mn-Gehalte waren unter Cd-Stress reduziert, ebenso wie die Fe-Gehalte der Wurzeln von Bur-0 nach Zn-Stress. Dagegen wurden erhöhte Zn-Gehalte in Bur-0 Wurzeln detektiert, anders als nach 1-wöchigem Zn-Stress. Dies weist darauf hin, dass eine längerfristige Akklimatisation an den Metallstress sich von der ersten Reaktion unterscheidet.

Für die Cd-Toleranz ist der Sulfatstoffwechsel der Pflanzen von großer Bedeutung. Sulfat ist ein wichtiges Substrat für die Produktion von Gluthation (GSH) [145]. GSH ist wiederum relevant für die Cd-Toleranz, einmal als Ausgangsstoff für die Produktion von Phytochelatinen (PCS), welche Cd binden und damit detoxifizieren können [78, 79, 82, 84], und zum anderen durch die Regulation des Redoxzustandes der Zelle [153]. So gibt es Hinweise darauf, dass der negative Effekt von Cd durch höhere Mengen an S im Medium gemildert werden kann [154]. Um diesen Zusammenhang in Bur-0 zu analysieren, wurde die Sulfateffizienz der beiden Ökotypen erfasst. Eine effizientere Aufnahme von Sulfat aus dem Medium könnte die Bildung von PCs in Bur-0 erleichtern. Unter Sulfatmangel sollte eine höhere Effizienz in der Aufnahme zudem zu einem Wachstumsunterschied führen. Der Test mit Hoagland Medium welches nur Spuren von  $\text{SO}_4^{2-}$  enthielt, zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen Bur-0 und

Col-0. Der Unterschied in der Cd-Toleranz liegt damit nicht an einer besseren Detoxifikation aufgrund einer effektiveren Synthese von PCs. Belegt wird dies auch durch die PC Produktion, die in Bur-0 nicht stärker durch Cd angeregt wurde. In beiden Ökotypen konnte eine vergleichbare Induktion der PC Produktion unter einer 1  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>-Behandlung beobachtet werden. Die höhere Cd-Toleranz in Bur-0 scheint nicht auf eine erhöhte Sulfateffizienz und auch nicht auf eine höhere PC Bildung zurückführbar zu sein. Der bereits bekannte und wichtige Cd-Detoxifikationsweg über Phytochelatine ist demnach nicht die Ursache für die erhöhte Cd-Toleranz von Bur-0. Somit kann der Toleranzunterschied für die Aufklärung eines neuen Mechanismus der Cd-Detoxifikation verwendet werden.

Die dem Bur-0 Phänotyp zugrunde liegenden genomischen Regionen sollten mittels QTL Mapping identifiziert werden. Dafür wurde der Genotyp der Bur-0 X Col-0 RIL Population [135], mit deren Cd-Toleranz korreliert. Durch diese statistische Analyse können QTL Regionen ermittelt werden, die die Position von Genen mit großem (> 25 %) Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps sehr genau eingrenzen. Die Distanz vom ursprünglich ermitteltem höchsten LOD Wert und dem Gen, welches abschließend als Phänotyp verursachend identifiziert werden konnte, betrug unter 11 Mappinganalysen jeweils weniger als 2 cM [136]. QTL Analysen werden dabei nicht nur in *Arabidopsis thaliana* für die Aufklärung von phänotypischer Variation verwendet. Bereits sehr früh wurden sie auch in der Untersuchung von Feldfrüchten wie Mais (1995) und später Reis (2001), Weizen (2003) und Tomate (2004) verwendet [155]. Der erste QTL welcher molekular aufgeklärt werden konnte, erfasste eine Variation des Blühzeitpunktes. Für diesen wurde 1994/1995 der FRI Locus identifiziert [117, 156]. Es folgten viele weitere Mapping Analyse. Besonders gut studiert ist dabei die Kontrolle des Blühzeitpunktes. In *Arabidopsis* wurden bis 2005 mehr als 100 QTL Regionen in verschiedenen Untersuchungen identifiziert, wobei nur wenige davon molekular aufgeklärt werden konnten [117, 155]. Ein Grund dafür, dass die häufig als „QTL Cloning“ bezeichnete molekulare Aufklärung hinter dem QTL Mapping zurück bleibt, ist zum einen die genetische Komplexität vieler der untersuchten Eigenschaften. Zum Beispiel bestehen die beiden Loci, die einen großen Teil der Variation in der Synthese von Glucosinolaten erklären, MAM und AOP, aus mehreren Genen die in Tandem angeordnet sind. Jedes einzelne Gen trägt unterschiedlich zur Transkriptmenge oder Enzymaktivität bei [156]. Auch können phänotypische Effekte, verursacht durch ein Gen, von mehr als nur

einem Polymorphismus ausgehen. Ein solches Beispiel findet sich in *Drosophila*, wo eine epistatische Interaktion zwischen einem AS-Polymorphismus und zwei Nukleotidpolymorphismen in der nicht-codierenden Region des *Dopadecarboxilase* Gens festgestellt werden konnten. Diese beeinflussen zusammen die Lebensdauer der Fruchtfliege [155]. Zum anderen werden phänotypische Unterschiede in der für das Feinmapping benötigten Generation zunehmend geringer, da sich bei dieser Analyse auf jeweils nur einen Locus konzentriert wird, welcher nur einen Anteil an der Ausprägung des Gesamtphänotyps hat. Eine verlässliche Unterscheidung der Phänotypen ist schlussendlich nicht mehr möglich. Damit können Phänotyp und Genotyp nicht mehr korreliert werden und eine weite Eingrenzung kann nicht erfolgen. Neben der gut untersuchten Beeinflussung des Blütezeitpunktes, konnten die natürliche Variation in *A. thaliana* noch für die molekulare Aufklärung einiger weiterer physiologischer Merkmale verwendet werden. Dazu zählen Kältetoleranz, Trichomendichte und die Lichtantwort [117, 121, 155, 156]. In Bezug auf Schwermetalle konnten QTL Analysen für die Aufklärung von Kupfer- (HMA5) und Zinktoleranzen (FRD3) verwendet werden. 2008 zeigten Kobayashi *et al.* den Unterschied in der Cvi-0, Ler-0 Cu-Toleranz und mappten diesen auf eine Region auf Chromosom 1 um 160 bis 170 cM. Durch weitere Markeranalysen konnte die Region weit genug eingegrenzt werden um HMA5, welches bereits 2006 als Cu-Transporter beschrieben worden war, als das wahrscheinlichste Kandidatengen zu identifizieren [124]. Die genetische Variation im *HMA5* Gen, in 103 *Arabidopsis* Ökotypen konnte genutzt werden um, in Kombination mit der jeweiligen Cu-Toleranz der Ökotypen, die funktional relevanten AS-Austausche im Protein zu identifizieren. In dem zweiten Beispiel, der Identifikation von FRD3 als Zn-Toleranzfaktor, wurde auf Chromosom 3 eine Region von ursprünglich ca. 4 kb identifiziert. Durch die Generierung einer *near isogenic line* (NIL), bei der eine RIL mit einem der Elternökotypen über 3 Generationen rückgekreuzt wurde, konnte das Intervall auf nur 7 Gene verkleinert werden. Von diesen war eines bereits in der Fe-Homöostase impliziert worden. Aus diesem Grund wurde der Citrat-Transporter FRD3 als Kandidatengen ausgewählt und konnte schließlich durch eine Komplementation des intoleranten Phänotyps bestätigt werden [157]. In beiden Fällen gelang eine molekulare Aufklärung, da in der gemappten genomischen Region Kandidatengene bereits mit der Schwermetallhomöostase in Verbindung standen. Aus diesem Grund konnten sie ausgewählt und der Effekt auf die Cu- und Zn-Toleranz in transgenen Linien und *knock-out* Linien analysiert und betätigt werden.

In der hier vorliegenden Mapping-Analyse für die höhere Cd-Toleranz von Bur-0, wurden 4 QTL Regionen ermittelt. Eine Region lag auf Chromosom 3 im Bereich von 16.67 Mb. Der LOD Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass es sich bei der Position um einen phänotyprelevanten Bereich handelt, erreichte hier 2.1. Der Locus war zu 8% an der Ausprägung des Gesamtphänotyps beteiligt. Zwei weitere Regionen mit LOD Werten von 3 lagen auf Chromosom 4 bei 5.6 bis 6.9 Mb und bei 14.8 bis 15.7 Mb und erklärten 13 bzw. 12.5 % des Phänotyps. Der höchste LOD Wert (7.2) wurde für Chromosom 5 in der Region von 1.6 bis 5.3 Mb errechnet. Hierdurch konnten 22 % des Phänotyps erklärt werden. Offensichtliche Kandidatengene in diesen 4 Regionen wurden durch einen Abgleich mit der Liste an Genen, impliziert in der Metallhomöostase, definiert (pers. Kommunikation Singh *et al.*). Dabei wurden Gene in unmittelbarer Nähe der höchsten LOD Werte präferiert. In der Region auf Chromosom 3 konnten so 4 Kationenaustauscher (*CHX4*, *CHX12*, *CHX11* und *CHX10*) identifiziert werden. Ein weiteres Gen (*Copt1*) weist keine Sequenzunterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 auf, weshalb keine Funktionsunterschiede der jeweiligen Proteine zu erwarten sind. In den beiden QTL Regionen auf Chromosom 4 liegen vier Gene (*Heavy metal transport/detoxification superfamily protein* und in der 2. Region die drei Gene *HMA2*, *HMA3*, *ZIP9*) mit Bezug zur Metallhomöostase. In der Region auf Chromosom 5, welche den höchsten Einfluss auf den Phänotyp hat, liegen zwei Gene die in Beziehung zur Metallhomöostase stehen (*mir398*, *microRNA family* und *ZIF1*, ein vakuolärer NA oder Zn-NA Transporter). Bei dieser Betrachtung wurde jedoch zum einen der Fokus auf Gene gelegt, welche bereits im Zusammenhang mit der Metallhomöostase beschrieben wurden. Im Kontext der Cd-Toleranz völlig neue Gene, können mit dieser Analyse nicht identifiziert werden. Auch ist die Eingrenzung auf ein 2 cM großes Intervall um den höchsten LOD Wert meist abhängig von der Größe des Effektes des jeweiligen QTL. Wie von Price *et al.* diskutiert, sind die verursachenden Gene vor allem in den Regionen mit großen (d. h. über 25%) Einfluss auf dem Phänotyp weniger als 2cM von dem höchsten LOD Wert entfernt [136]. Erfolgt diese Eingrenzung nicht, so wurden 8 Gene im Intervall auf Chromosom 3, 1 Gen in Region 1 auf Chromosom 4, 11 Gene in der größeren zweiten Region auf Chromosom 4 und 3 Gene in der QTL Region auf Chromosom 5 detektiert.

Die größte Evidenz für einen Einfluss auf die Cd-Toleranz ist dabei für das Gen *HMA3* (At4G30120) präexistent [94, 95, 126, 158]. Es lag in der zweiten QTL Region auf Chromosom 4, 64 kb vom höchsten LOD Wert entfernt. *HMA3* ist ein Tonoplast lokalisierter

Schwermetall-Transporter der unterschiedlicher Substratspezifität in unterschiedlichen Organismen zu besitzen scheint. So ist *OsHMA3* verantwortlich für den Spross/Reiskorn-Cadmiumgehalt von Reis. Die Überexpression einer funktionalen Variante führte zu geringerer Cd-Translokation, beeinflusste jedoch weder Zn noch Fe-Gehalte in Reiskörnern [10]. *AtHMA3* aus dem Ökotyp *Ws-0* (funktionaler Haplotyp [93]) führt bei Überexpression dagegen zur Cd- und Zn-Toleranz [94]. Das *HMA3* Gen aus dem Ökotyp *Bur-0* (*HMA3<sub>Bur-0</sub>*) wurde für eine Komplementation in *Col-0* transferiert. Dabei wurde die genomische Region um *HMA3<sub>Bur-0</sub>* mit transferiert um die *Bur-0*-spezifische Regulation des Gens in *Col-0* beizubehalten. Eine Überexpression kann zu artifiziellen Effekten auf die Metalltoleranz führen. So zu sehen bei Lee *et al.*, hier führte die Überexpression des, für die Cd-Detoxifikation essenziellen *AtPCS1* kurioserweise zur Cd-Hypersensitivität [159]. Neben der Expression des *HMA3<sub>Bur-0</sub>* in *Col-0* wurde das Gen auch in *cad1-3* transferiert. Da, laut MAPQTL5® Berechnung, der Effekt den *HMA3* in *Bur-0* auf die Cd-Toleranz hat nur 12.5 % beträgt, was bei einem Wachstumsunterschied der Ökotypen von im Mittel 25 % nur ca. 3 % entspricht, könnte eine Komplementation schwer nachweisbar sein. Der Wachstumsunterschied der *cad1-3* Mutanten zu *Bur-0* ist deutlich größer (59 %) und es bestand die Möglichkeit, dass in diesem Hintergrund ein Effekt von *HMA3<sub>Bur-0</sub>* besser sichtbar wird. Da sich das absolute Wachstum der transgenen Linien bereits unter Kontrollbedingungen vom Wachstum von *Col-0* unterschied, war die Detektion einer höheren Toleranz nur für eine der transgenen Linien möglich. Sie zeigte unter 2  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  ein 10 % längeres rel. Wurzelwachstum als *Col-0*. Außerdem verbesserte *HMA3<sub>Bur-0</sub>* das Wachstum von 2 der transgenen *cad1-3* Linien unter beiden analysierten Bedingungen. Dadurch kann geschlussfolgert werden, dass entweder: der Beitrag von *HMA3* an der höheren Toleranz von *Bur-0* zu gering ist um ihn verlässlich zu detektieren, oder: dass *HMA3* nicht beteiligt ist am Cd-Toleranzunterschied zwischen *Bur-0* und *Col-0*. In diesem Fall ist ein weiteres, bisher unbekanntes Kandidatengen in der QTL Region auf Chromosom 4 toleranzrelevant.

Funktionales *HMA3* führt zum Transport von Schwermetallen wie Cd in die Wurzelvakuole. Damit wird die Cd-Translokation in den Spross reduziert, weshalb Spross-Cd-Gehalte verringert sind [93]. Auch in *Bur-0* fanden sich geringere Cd-Gehalte im Spross. Eine effizientere Detoxifikation von Cd in der Wurzelvakuole in *Bur-0* kann die höhere Cd-Toleranz jedoch nur zum Teil erklären, da auch in der Wurzel nach 1-wöchigem Cd-Stress

weniger Cd zu finden war. Es könnte zum Beispiel ein weiterer, bisher unbekannter Transporter in Bur-0 die Cd-Aufnahme reduzieren. Ein solcher war nicht unter den bereits im Zusammenhang mit Schwermetallen annotierten Genen in den QTL Regionen zu finden. Unter den Genen der QTL Regionen die im Zusammenhang mit Schwermetallen beschreiben wurden, konnte mit den bisher vorliegenden Informationen kein eindeutiges Kandidatengen identifiziert werden.

Aus diesem Grund, wurde die molekulare Aufklärung des QTLs auf Chromosom 5, welcher den höchsten Einfluss auf die Cd-Toleranz hat, angestrebt. Durch diese Analyse können neben, bisher komplett unbekannten Cd-Toleranzfaktoren auch Gene identifiziert werden, wenn sie im größeren Abstand zum höchsten LOD Wert lokalisiert sind. Diese Möglichkeit muss aufgrund des relativ geringen Effektes (22 %) der QTL Region auf Chromosom 5 in Betracht gezogen werden. Für die Eingrenzung wurde das Intervall durch Markeranalysen ausgewählter RILs verkleinert. Die so ermittelte Region mit Kandidatengen lag bei 2.9 bis 3.84 Mb. Die darin enthaltene waren 292 Gene von At5G09370 bis At5G11900. Im weiteren Verlauf sollte eine Verkleinerung des Intervalls durch Kreuzung einer RIL mit Col-0 erreicht werden. Diese RIL enthielt Bur-0 Allele im Intervall, angrenzend jedoch Col-0 Allele. Durch weitere Rekombinationsereignisse in der Gametenbildung der F1 einer solchen Kreuzung, sollten in der F2 Individuen mit kleineren, Bur-0 genotypischen Bereichen erzeugt werden. Unter den 40 analysierten F2 Individuen fand sich kein Rekombinationsereignis im Intervall. Eine weitere Eingrenzung konnte mit dieser Generation nicht erfolgen. Um die molekulare Eingrenzung im Folgenden zu ermöglichen, wäre die Generation einer *near isogenic line* (NIL) in Betracht zu ziehen. Dabei wird die ausgewählte RIL nicht nur einmal, sondern über mehrere Generationen mit Col-0 rückgekreuzt, so geschehen z. B. bei Pineau *et al.* [157]. Die so etablierte NIL enthält hauptsächlich Col-0 Allele im gesamten Genom, besonders aber um die Region welche eingegrenzt werden soll. Unter mehr als 2000 Nachkommen der NIL wurde bei Pineau *et al.* Phäno- und Genotyp zur Eingrenzung des Intervalls auf eine Region von 23 kb mit insgesamt nur 7 Genen kombiniert.

Da eine weitere molekulare Eingrenzung des Intervalls mit der hier etablierten Rückkreuzung nicht möglich war, wurden Informationen über den Bur-0, Col-0 Genotyp der Gene im Intervall herangezogen. Unter den insgesamt 292 Genen der Region wurden diejenigen selektiert welche Aminosäure (AS)-verändernde SNPs, Deletionen oder Insertionen in der codierenden Region enthielten. Sie wurden als Kandidatengene definiert. Zudem wurde die



Konservierung der von Austausch betroffenen Aminosäuren mit dem SIFT Algorithmus untersucht [142, 143]. Ist eine Aminosäure konserviert, so ist es wahrscheinlicher, dass eine Veränderung die Proteinfunktion beeinflusst. Dadurch ergab sich eine Liste mit 15 Genen im gemappten Intervall, deren Nukleotidsequenzen in einem der beiden Ökotypen zu nicht tolerierten AS-Austauschen führten. Zudem wurden 3 Gene mit Deletionen in der codierenden Sequenz identifiziert, sowie 8 Gene mit Insertionen. Für keines der Gene ist bisher ein Zusammenhang mit der Cd-Detoxifikation bekannt. Sie sind nicht im Zusammenhang mit Schwermetallen annotiert (pers. Kommunikation Singh *et al.*), weshalb sich kein unmittelbares Kandidatengenes aus dieser bioinformatischen Analyse ergab. Dabei können Fehler in der Annotierung der Genomsequenzen durchaus eine Fehlerquelle dieser Analyse sein. Im 1001 *genomes* Projekt werden *Arabidopsis* Ökotypen sequenziert, die Sequenzen jedoch stets auf Basis des Col-0 Referenzgenoms assembliert. Das Col-0 Genom bleibt das einzige, für welches *de novo* eine Assemblierung durchgeführt wurde [19]. Die referenzbasierte Sequenzierung hat einige Fehlerquellen. So ist die Referenzsequenz selbst fehlerhaft. 2005, 5 Jahre nach der ursprünglichen Veröffentlichung der Sequenz, konnten mehr als 2000 Abweichungen detektiert werden [19]. Zudem eignet sich das Alignment der kurzen Sequenzen in der referenzbasierten Sequenzierung weder zur Erfassung von Insertionen, noch von repetitiven Regionen und Regionen hoher Abweichung vom Referenzgenom [19]. Das korrekte Gen basierend allein auf bioinformatischen Methoden auszuwählen, ist aus diesem Grund schwierig. Es sollten zusätzliche Daten, wie eine weitere molekulare Eingrenzung der Region, wie zuvor bereits angesprochen, oder Informationen über den möglichen Mechanismus der höheren Cd-Toleranz in Bur-0 in die Auswahl der Kandidatengene mit einfließen.

Bis zu diesem Punkt konnte gezeigt werden, dass das Gen welches für den größten Teil der höheren Toleranz in Bur-0 verantwortlich ist sich sicher im Intervall zwischen den Genen At5G09370 bis At5G11900 befindet. Darin liegen 3 Gene welche bereits in einem Bezug zur Metallhomöostase beschrieben wurden. keines dieser Gene ist jedoch aufgrund der bioinformatischen Analyse ein Kandidat. Stattdessen wurden bei dieser 26 Gene mit veränderter AS Sequenz und möglicherweise auch veränderter Protein Funktion identifiziert. Davon wurde bisher keines in einem Zusammenhang mit Cd beschrieben.

Eine Möglichkeit mehr über den Mechanismus der höheren Cd-Toleranz in Bur-0 zu erfahren, ist die Analyse der Expression der 292 Gene im Intervall auf Chromosom 5. Um gleichzeitig auch mehr über die generelle Antwort von *Arabidopsis thaliana* auf physiologisch relevanten Cd-Stress zu erfahren, wurde in einer Microarrayanalyse die Veränderung der genomweiten Genexpression in Bur-0 und Col-0 durch eine Cd-Behandlung erfasst. Es wurde ein moderater Stress gewählt, welcher die Pflanzen nicht zu stark schädigt. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Expression hauptsächlich auf unspezifischere sekundäre Effekte zurückzuführen sind die zum Tod der Zellen führen. Der Cd-Toleranz Phänotyp von Bur-0 war in der rel. Blattfläche, im rel. Wurzelgewicht und in der photosynthetischen Aktivität nachweisbar. Die Bestätigung der Microarrayanalyse erfolgte durch separate Detektion der Expression zweier Gene mittels q RT-PCR. Es wurde die gleiche Responsivität der Gene festgestellt und damit die Ergebnisse des Microarrays bestätigt.

Da der phänotypische Unterschied auch auf einem in Bur-0 anders reguliertem Gen basieren kann, statt auf einem Unterschied in der AS Sequenz eines Proteins was dessen Funktion beeinflusst, wurde die Expression der Gene des gemappten Intervalls analysiert. Zunächst wurden Gene detektiert deren Expression sich nach Cd-Behandlung oder zwischen den Ökotypen mindestens 2fach unterschied. Diese differenziell regulierten Gene im QTL Intervall wurden geclustert. So wurden Gene identifiziert welche eine Cd-bedingte, spezifische Regulation aufwiesen. 13 dieser differenziell regulierten Gene liegen zudem nahe am höchsten LOD Wert und sind aus diesem Grund höher priorisierte Kandidatengene [136]. Die Cluster 2, 3 und 5 wurden zudem als diejenigen mit dem höchsten Potenzial, ein Kandidatengen zu enthalten, eingestuft, da die Expression unter Cd-Behandlung hier zwischen den Ökotypen sehr unterschiedlich war (Tab. 9, Abb. 29). 6 Gene in diesen Clustern liegen zudem nahe am höchsten LOD Wert. Sie sind bisher uncharakterisiert und eine Verbindung zu Cd ist noch nicht bekannt. Der Einfluss der Gene auf die Cd-Toleranz ließe sich durch Komplementationsstudien erfassen. Das Gen welches zum Cd-Phänotyp beiträgt, könnte jedoch auch außerhalb 4 cM großen Region um den höchsten LOD Wert zu finden sein. Insbesondere wenn bedacht wird, dass der Effekt der QTL Region auf Chromosom 5 nur ca. 22 % am gesamten Phänotyp ausmacht und damit als „*minor*“ QTL klassifiziert wird [136]. Für *minor* QTL Regionen kann das verantwortliche Gen ebenfalls sehr dicht am höchsten LOD Wert liegen, es gibt aber auch gegensätzliche Beispiele.

Ein interessantes Beispiel eines Gens in Cluster 5 ist einen Mg-Transporter At5G09690 (MGT7; MRS2-7) welcher in Bur-0 induziert wird und in Col-0, obwohl bereits unter Kontrollbedingungen schwächer exprimiert, reprimiert wird. Für MRS2-7 konnte gezeigt werden, dass er neben Mg auch Zn transportiert [160]. *MRS2-7* wird spezifisch in den Leitgeweben der Wurzelhaarzone und den Seitenwurzeln exprimiert, sowie in der meristematischen Region der Wurzel [161]. Gebert *et al.* zeigten 2009 die Lokalisierung von MRS2-7 in der ER Membran, spekulierten aber auch darüber, dass das Protein evtl. in verschiedenen Endomembransystemen zu finden sein könnte [161]. In Bur-0 könnte ein durch MRS2-7 verstärkter Zn-Transport in das ER dieses vor den negativen Effekten von Cd schützen. Dass das ER ein besonders Cd-sensitives Kompartiment der Zelle ist, wurde bereits 2002 nach Untersuchungen von Clemens *et al.* vermutet. Durch die Analyse der Cd-Toleranz von  $\Delta zhf$  Hefen konnte gezeigt werden, dass der ER-lokalisierter Zn-Transporter Zhf auch Cd transportiert. Ist das Gen mutiert findet kein Cd-Transport in das ER statt und die Zellen sind toleranter als der WT, trotz gleicher Cd-Aufnahmerate aus dem Medium [162]. Der schädliche Effekt von Cd im ER liegt möglicherweise an der Verdrängung essenzieller Zn-Ionen aus vielen neu synthetisierten Proteinen. Erhöht sich die Zn-Konzentration im ER durch eine verstärkten Transport aufgrund einer höheren MRS2-7 Expression, verhindert dies die Verdrängung von Zn aus den Proteinen. Eine Bestätigung von MRS2-7 als Cd-Toleranz-vermittelnd könnte durch Expression des Gens *MRS2-7* unter Kontrolle eines Bur-0 Promotors in Col-0 erreicht werden oder durch Überexpression von MRS2-7 in Col-0. In beiden Fällen sollte eine erhöhte Zn-Transportrate ins ER vor der Cd-Toxizität schützen.

Durch die Microarrayanalyse konnten zusätzliche Daten über die Expression der 292 Kandidatengene aus dem QTL Intervall auf Chromosom 5 gesammelt werden. Unter der Annahme, dass ein Toleranzunterschied von einem Unterschied in der Expression eines Gens in der QTL Region vermittelt wird, konnten 20 Gene als Kandidaten identifiziert werden. Von diesen liegen 6 nahe am höchsten LOD Wert, was ihnen zusätzlich Priorität verleiht. Tatsächlich sind jedoch auch eine Reihe von anderen Szenarien als der unterschiedlichen Expression unter Cd-Behandlung als Grundlage für den beobachteten Phänotyp denkbar, weshalb eine zusätzliche genetische Eingrenzung der QTL Region hilfreich wäre.

Die Analyse der Expression der in der QTL Region befindlichen Gene erlaubt Rückschlüsse auf mögliche Toleranz-relevante Regulationen in Bur-0. Eine Analyse aller responsiven Gene in Bur-0 und Col-0 ermöglicht dagegen Rückschlüsse über die Cd-Detoxifikation in *A. thaliana* generell. Die regulatorische Antwort von Pflanzen auf eine Cd-Behandlung wurde bereits zuvor analysiert, zum Beispiel in einer Analyse der frühen Cd-Antwort in dem *A. thaliana* Ökotyp Col-0 durch Herbette *et al.* [85]. Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass die Sulfat-Assimilation als Reaktion auf Cd-Stress induziert wird. Herbette *et al.* postulierten, dass durch eine erhöhte Sulfatassimilationsrate vermehrt Substrate für die Bildung von PCs zur Verfügung gestellt werden können. Diese sind die wichtigsten Cd-detoxifizierenden Peptiden in Pflanzen und essenziell für deren Toleranz (u. a. [78]). Dieser Zusammenhang wurde auch für andere Schwermetalle demonstriert, welche durch Phytochelatine detoxifiziert werden. So beschrieben Fu *et al.* 2014 eine Induktion der Expression von S-Assimilationsgenen sowie von PCS als Reaktion auf As-Behandlung von zwei *A. thaliana* Ökotypen [147]. Außer der S-Assimilation wurde von Herbette *et al.* eine Veränderung in einer Reihe weiterer Stoffwechselwege gezeigt. Zum Beispiel waren Komponenten der Zellwandstruktur in ihrer Expression beeinflusst, wobei zellwandverstärkende Mechanismen induziert und Prozessen des Zellwandwachstums dagegen reprimiert wurden. In Blättern war die Synthese von Phenylpropanoiden induziert. Photosynthesegene wurden dagegen in ihrer Expression reprimiert und einige Signalwege ( $\text{Ca}^{2+}$ , Ethylen) schienen ebenfalls durch Cd beeinflusst zu sein [85]. Mortel *et al.* zeigten 2008, bei einer Untersuchung der Expressionsänderungen durch Cd-Stress in *A. thaliana* und *Noccea caeruleascens* (ehemals *Thlaspi caeruleascens*), ebenfalls eine Induktion von Genen mit Effekt auf die Biosynthese von Zellwandkomponenten [163]. Daneben wurden Gene der Stressantwort und Pathogenabwehr induziert. Einige Metallhomöostasegene waren ebenfalls in ihrer Expression durch Cd-Behandlung beeinflusst. Jedoch schlussfolgerten Mortel *et al.*, dass im Vergleich zu expressionellen Veränderungen induziert durch Zink weniger die Metallhomöostase transkriptionell verändert wird, sondern vor allem Effekte auf die Lignin Biosynthese und die Schwefelassimilation sichtbar werden. Dabei wurde die Lignin Biosynthese sowie auch Gene der allgemeinen Stressantwort durch Cd, aber auch durch Zn induziert [151, 163]. So können durch einen Vergleich des Einflusses verschiedener Metalle auf die Genexpression ebenfalls Rückschlüsse auf die jeweilige Wirkung auf die Pflanzen gezogen werden. Die Expressionsänderungen induziert durch eine Behandlung mit Zn

wurden zum Beispiel analysiert durch Becher *et al.* 2004, Talke *et al.* 2006 und Mortel *et al.* 2006. Es konnte gezeigt werden, dass Zn die Expression vieler Metalltransporter oder Metallhomöostase-relevanter Gene beeinflusste wie zum Beispiel HIPP14, MTP9, ZIP5, ABCC2, OAS-TL, FRO2, FRO3 oder Nramp1 [164, 165, 151]. Daneben konnte, ähnlich wie bei Cd, eine Induktion von Genen der Stressantwort [152, 164], eine Veränderung in der Zellwandsynthese [152, 163] und eine Induktion in der Phenylpropanoidsynthese [151] festgestellt werden.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass transkriptionelle Veränderungen durch Cd-Stress bisher nicht ausreichend verstanden sind. Neben dem Einfluss auf die bekannten Metallhomöostasegene (der bei Cd möglicherweise sowieso geringer ist als bei essenziellen Mikronährstoffen wie Zn) konnte vor allem der Bezug zur S-Assimilation hergestellt werden. Auch ein noch nicht näher geklärter Zusammenhang mit der Pathogenresistenz könnte durch diese Microarrayanalysen angedeutet sein. Davon abgesehen sind hauptsächlich Gene der allgemeinen Stressantwort betroffen und Gene, welche Wachstum und Zellwandstruktur beeinflussen. Viele der Microarrayanalysen betonen jedoch auch, dass ein hoher Anteil der regulationsveränderten Gene unbekannt ist. Auch über die Transkriptionsfaktoren oder die Signalwege welche durch Cd beeinflusst werden ist bisher fast nichts bekannt, auch wenn sie einen signifikanten Anteil der Gene ausmachen, die in ihrer Expression beeinflusst sind. Je mehr Informationen über Effekte von Cd auf die Expression zugänglich werden, um so mehr dieser offenen Fragen können möglicherweise beantwortet werden.

Zu diesem Zweck sollte in diesem Versuch die genomweite Expression in Col-0 und Bur-0 unter möglichst naturnahen Bedingungen, das heißt bei niedrigen Cd-Konzentrationen, analysiert werden. So sollte möglichst die Reaktion erfasst werden, die Pflanzen auch unter natürlichen Bedingungen zeigen. Bei diesen geringen Konzentrationen werden weniger sekundäre Effekte auf regulatorischer Ebene sichtbar. Diese entstünden zum Beispiel durch die Cd-induzierte ROS Bildung [166].

Insgesamt wurde in der vorliegenden Microarrayanalyse die Expression von 16956 Genen detektiert. Davon sind 1680 Gene (10 %) in Col-0 Cd-responsiv (mindestens 2fache Expressionsveränderung) und 1980 Gene (11 %) in Bur-0. Eine Suche nach Funktionen, die in Cd-responsiven Genen angereichert sind, ergab überrepräsentativ viele Zellwand Gene und natürlich Gene der Stressantwort. Hier bestätigen sich Observationen früherer

Microarrayanalysen mit sowohl Cd als auch Zn. Die Zellwand ist einer der Schwermetallspeicher [25, 114, 167]. Änderungen in der Regulation der Gene die am Aufbau und der Restrukturierung der Zellwand beteiligt sind könnten zu Verbesserungen in der Cd-Bindung der Zellwand führen und zeigten demnach möglicherweise eine Akklimation an höhere Cd-Konzentrationen. Daneben ist eine Repression von Zellwandgenen ein Indiz für eine Wachstumsinhibition. Ressourcen werden in die Cd-Detoxifikation und nicht in das Wachstum gesteckt.

Dagegen konnte für den Sulfatmetabolismus keine statistisch signifikante Überrepräsentation unter den Cd-induzierten Genen gefunden werden. Im konkreten Vergleich der Regulation einzelner Gene zu der von Herbette *et al.* detektierten Regulation, konnten jedoch Gemeinsamkeiten festgestellt werden. So wurde eine Induktion von 4 und eine Repression von 2 der insgesamt 14 bekannten Sulfattransporter gezeigt. Nach 1-wöchigem Cd-Stress in Bur-0 und Col-0 sind 5 Sulfattransporter (3 davon ausschließlich in Bur-0) induziert und zwei andere reprimiert. 4 der Transporter welche von Herbette *et al.* 2006 als Cd-responsiv identifiziert wurden, konnten mit dem vorliegenden Microarray bestätigt werden. Auch für die weiteren Reaktionsschritte, notwendig für die Assimilation von Schwefel und die anschließende Produktion von PCs, konnte eine Cd-induzierte Regulation gezeigt werden, auch wenn teilweise andere Gene durch Cd in ihrer Regulation verändert wurden, als von Herbette gezeigt. Obwohl eine statistische Analyse keine signifikante Anreicherung von Genen dieses metabolischen Pfades detektierte ist klar, dass auch in der vorliegenden Microarrayanalyse die Induktion der S-Assimilation als Antwort auf eine Cd-Behandlung nachweisbar ist. Dabei schien, wie auch schon von Herbette *et al.* demonstriert, die Induktion von Sulfattransportern für die Verbesserung der Sulfatversorgung während des Cd-Stresses von größerer Bedeutung, als eine Induktion von Enzymen in der danach folgenden Synthese von zunächst Cystein, GSH und schließlich PCs. Die Enzyme welche für diese Reaktionen erforderlich sind werden stattdessen posttranslational aktiviert und weisen unter Cd-Stress eine höhere Aktivität auf [83, 85].

Ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Ökotypen war die Überrepräsentation von Genen der Signalübertragung unter in Bur-0 Induzierten. Sowohl für Cd als auch für Cu konnte bereits eine Induktion von Komponenten der Signaltransduktion gezeigt werden [168]. So könnte eine Überrepräsentation dieser Gene in Bur-0 implizieren, dass mehr Detoxifikationswege induziert werden.

Im vorliegenden Microarray konnten bekannte Reaktionen auf Cd-Stress, wie die Induktion von Genen welche im Zusammenhang mit abiotischem Stress stehen oder eine Induktion der Sulfataufnahme, dokumentiert werden. Dabei waren einige dieser Prozesse signifikant unter Cd-regulierten Genen angereichert. Andere, wie die Induktion der Sulfataufnahme, ließen sich nur durch detaillierte Analyse der Gene eines metabolischen *Pathways* erfassen.

In einer zweiten Analyse wurden die Gene die eine differenzielle Regulation zeigten in Cluster unterteilt. Dadurch konnten 6 Hauptcluster und 16 Nebencluster definiert werden, welche sich durch ihr Expressionsmuster unter Cd-Stress, in den beiden Ökotypen unterschieden. Innerhalb dieser Gruppen konnten Anreicherungen von funktionellen Klassen identifiziert werden. Einige waren dabei charakteristisch für das jeweilige Cluster und konnten in keinem anderen identifiziert werden (Tab. 12 – 17).

Zunächst wurde ein Blick auf die Gene mit den stärksten Expressionsunterschieden geworfen. In einigen Fällen ermöglichte dies Einsichten in einen wichtigen Toleranzmechanismus. Zum Beispiel zeigten Weber *et al.* den starken Einfluss von NAS2 auf die Metallhyperakkumulation. Das Gen wurde als Kandidat aufgrund einer sehr viel höheren Expression in der Zn-toleranteren Art *A. halleri* identifiziert [152]. Besonders interessant für die Erklärung des Cd-Toleranzunterschiedes ist Hauptcluster V (44 Gene), welches Gene enthält die in Bur-0, aber nicht in Col-0 Gene durch Cd induziert wurden. Deren Expressionslevel sind dadurch in Bur-0 unter Cd-Stress höher als in Col-0. Dass eine höhere Expression eines Gens die Cd-Toleranz positiv beeinflussen kann, wurde zum Beispiel an *TcHMA3* (*Thlaspi caerulescens* HMA3) gezeigt [95]. In Cluster V ist das am stärksten induzierte Gen At1G21120 oder, *Indole Glucosinolate O-Methyltransferase 2* (*IGMT2*). IGMT2 katalysiert nach ersten Hinweisen, die Transformation von 4-Hydroxyindol-3-yl-Methylglukosinolat (4OH-I3M) zu 4-Methoxyindol-3-yl-Methylglukosinolat (4MO-I3M) [169]. Indol Glukosinolate sind für die unspezifische Immunantwort wichtig. Welche Verbindung daneben zur Cd-Toleranz bestehen könnte ist bisher jedoch nicht untersucht.

Für die umgekehrte Situation, nämlich einer Repression und damit eines geringeren Expressionslevels in Bur-0 als in Col-0, müssen die Nebencluster herangezogen werden. Besonders Cluster 13 ist hier interessant, da es zudem kaum Expressionsänderungen der 24 darin enthaltenen Gene in Col-0 gibt. In diesem Fall könnte ein Toleranzunterschied z.B. durch einen, in seiner Expression verminderten, Cd-Transporter vermittelt werden. Dieser

Mechanismus wurde beispielsweise für den Reis Transporter OsLCT1 gezeigt. Dessen Transkriptreduktion durch RNAi führte zu einem verringerten Cd-Transport [11]. Das am stärksten regulierte Gen dieser Gruppe ist AT3G59940, „*Kelch Repeat F-Box 50*“ (KFB50) Protein. Es ist in Bur-0 4fach reprimiert, in Col-0 nicht Cd-responsiv und in Bur-0 unter Cd-Stress 3.5fach geringer exprimiert als in Col-0. AT3G5990 (KFB50) wurde in der Regulation der Phenylpropanoid-Biosynthese impliziert [170]. KFB50 führt durch Interaktion mit Phenylalanin-Ammoniak-Lyasen (PAL), die den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Phenylpropanoid *pathway* katalysieren, und dem E3 Ligase Komplex zur Degradation von PALs und damit zur Verringerung der PAL Aktivität. Ein *knock-out* von 3 KFBs führt damit zur Stabilität der PALs und konsequenterweise zu erhöhten Lignin-, Anthocyanin- und Sinapoyl-Malatbildung. Eine Anreicherung von Lignin könnte möglicherweise zur Cd-Toleranz beitragen, indem die Zellwandstruktur verändert und das Wachstum eingeschränkt würde. Dadurch würden Ressourcen für die Cd-Detoxifizierung zur Verfügung gestellt [171, 172]. Anthocyane sind wichtig für die Verminderung des oxidativen Stresses der durch Cd ausgelöst wird. Eine Induktion der Anthocyanbildung durch Cd konnte beispielsweise für Cd-behandelte *Phaseolus coccineus* Pflanzen gezeigt werden [173]. Zudem haben vorangegangene Microarray Studien ebenfalls einen Einfluss von Cd auf die Phenylpropanoidsynthese notieren können [85, 151, 163]. Um zu untersuchen, ob AT3G5990/KFB50 tatsächlich einen Effekt auf die Cd-Toleranz hat, könnten KMD-Mutanten unter Cd-Stress analysiert werden. Auch eine Detektion von Lignin und Anthocyanen in Bur-0 und Col-0 könnte Hinweise auf einen Einfluss des Stoffwechselweges auf die Cd-Toleranz liefern. In diesen Fall könnten die Proteine deren Degradation nach Cd-Behandlung durch eine Reduktion von KMD4 vermindert wurde, über Ko-Immunopräzipitation identifiziert werden und so möglicherweise ein Cd-initiiertes Signalübertragungsweg aufgeklärt werden.

Wichtiger für die Analyse der generellen Cd-Antwort in Pflanzen, als die Betrachtung von einzelnen Genen mit starken transkriptionellen Veränderungen, ist die Detektion von Regulationsveränderungen die mehrere Gene eines metabolischen Pfades betreffen. Dafür wurden funktionell angereicherte Gruppen innerhalb eines Clusters detektiert.

Auch hier wurden zunächst Cluster mit Bur-0 und Col-0 spezifischer Expression analysiert. Keines der Hauptcluster welches ein Bur-0 oder Col-0 spezifisches Expressionsverhalten aufwies (II und V) zeigte eine Funktionsanreicherung die in anderen Clustern nicht zu finden



war. Auch für die Nebencuster 4 und 15, welche ein spezifischeres Genset definieren, konnte keine einmalige Funktionsanreicherung festgestellt werden. Es gibt demnach keine Hinweise darauf, dass die Veränderung der Regulation eines konkreten metabolischen Pfades in Bur-0 die erhöhte Cd-Toleranz vermittelt. Vielmehr könnte die Regulation einzelner Gene in mehreren funktionellen Gruppen erforderlich sein, um den Unterschied in der Detoxifikation von Cd zu bewirken. Dabei sind möglicherweise kleine Verbesserungen in der Effektivität von Detoxifikationswegen ausschlaggebend, die grundsätzlich auch in Col-0 aktiv sind.

Die generelle Cd-Antwort, wie sie von Genen in den Hauptclustern I und III bzw. IV und VI vermittelt wird, ergab einige funktionelle Anreicherungen.

In Cluster I und III waren Gene mit Funktionen in der Zellwandrestrukturierung und spezifischer, in der Zellwandlockerung angereichert. Eine Lockerung der Zellwand ist für das Streckungswachstum notwendig. Dies spricht für eine Repression des Wachstums wie sie auch tatsächlich unter Cd-Stress beobachtet werden kann. Daneben wäre auch eine Restrukturierung zur Lagerung von Cd in der Zellwand möglich. In Cluster III waren zudem Gene mit Funktionen in der Photosynthese angereichert. Eine Reduktion der Expression von Photosynthesegenen ist zum einen als Einschränkung von Wachstumsprozessen zu verstehen, wie es auch Repressionen von Zellwandstreckungsgenen sind. Zum anderen führt der Elektronentransfer während der Photosynthese zur Bildung von ROS [37]. Um die Konzentration an ROS, die durch Cd erhöht wird, möglichst gering zu halten ist eine Reduktion der Photosynthese eine sinnvolle Schutzmaßnahme.

In Cluster IV fanden sich 30 Gene welche Chitin responsiv sind. Dies entspricht einem Anteil von 3.4 % an allen im Cluster enthaltenden Genen. Dagegen machen Chitingene insgesamt nur 0.3 % der exprimierten Gene im Genom aus. Neben dieser GO Gruppe hatten noch weiter im Cluster IV mit der Pathogenantwort zu tun. Damit war erneut die Verbindung von der Regulation nach Cd-Stress und der Regulation durch biotische Stressoren dargelegt. Unter den drei funktionellen Gruppen die in Cluster IV und Cluster VI angereichert waren, fanden sich Gene der ABA-Reaktion. Dies lässt möglicherweise auf eine Verbindung von dem Cd- und ABA-*signaling* schließen. Außerdem waren in beiden Clustern Gene der SA und JA Antwort überrepräsentiert.

Was kann daraus für die Cd-vermittelte Signalübertragung in Pflanzen abgeleitet werden? Bisher ist nicht bekannt ob es für Cd einen Sensor in der Pflanze gibt, welcher die Anwesenheit im Zytosol detektiert und die Cd-Antwort induziert. Möglicherweise existiert ein solcher Sensor, wenn überhaupt, auch nur für die essenziellen Metalle wie Zn und Fe. Dann könnte ein *Cd-signaling* eng an eine Signalübertragung durch  $\text{Ca}^{2+}$  oder eben auch durch Phytohormone gekoppelt sein. Bisherige Untersuchungen, die einen möglichen Mechanismus der Cd-Signalübertragung analysieren, implizieren ein verändertes GSH/GSSG Verhältnis, welches Auswirkungen auf den Redoxzustand der Zelle hat, als möglichen Sensor [174]. Daneben spielt aber auch die Generierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Cd-Stress eine Rolle. Für dieses Signalmolekül ist bereits bekannt, dass es verschiedene transkriptionelle Reaktionen vermittelt. So zeigt sich an dieser Stelle eine Verbindung von Cd zu dem Phytohormon Abscisinsäure (ABA). Für  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte gezeigt werden, dass es an der Vermittlung der Reaktion auf ABA beteiligt sein kann [175]. Auch unter den Cd-regulierten Genen dieser Analyse fanden sich, in den Clustern III und IV, Anreicherungen der funktionellen GO Klasse „*response to oxidative stress*“. Bei dieser handelt es sich um eine Überklasse von „*Response to Reactive Oxygen species*“. Neben der Verbindung von Cd und der Signalübertragung induziert durch ROS, konnte auch eine Beeinflussung des  $\text{Ca}^{2+}$ -*signalings* durch Cd dokumentiert werden [176].  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt als Signalmolekül diverse Antworten, wie zum Beispiel die Reaktion auf abiotische Faktoren wie Licht, Temperatur oder mechanische Reize, aber auch auf Faktoren wie das Phytohormon ABA [177, 178]. Der Einfluss von Cd auf die Ca-vermittelte Signalübertragung liegt möglicherweise in der Störung des Ca-Haushaltes [176]. Es konnten unter Cd-induzierten Genen in Cluster IV signifikante Anreicherungen von Genen detektiert werden, welche relevant für die Ca-Homöostase sind (GO Klasse „*calcium ion homeostasis*“).

Diverse Änderungen in der Konzentration verschiedenster Signalmoleküle und Phytohormone sind bereits als Resultat von Cd-Stress detektiert worden [179]. So kann ABA durch Cd-Stress angereichert werden. Dabei wurden unterschiedliche Effekte detektiert, wie zum Beispiel die ABA vermittelte Auflagerung von Wachsen auf der Blattepidermis von Gerste oder die erhöhte Cd-Toleranz in Reis nach ABA Zugabe, welche vermutlich auf eine Änderung in der Transpiration durch ABA und damit einhergehender Änderung der Cd-Translokation beruht [180, 181]. Gegensätzliche Effekte wurden jedoch auch beobachtet, wobei hieraus geschlossen wurde, dass eine starke Reduktion der metabolischen

Aktivität mit der Reduktion der ABA-, IAA- (Auxin) und Cytokininkonzentration einhergeht [182]. Auch für IAA und Ethylen konnte in einer anderen Studie eine Konzentrationserhöhung nach Cd-Behandlung festgestellt werden. Hierin wurden die typischen hormonellen Veränderungen, detektierbar während der Seneszenz wieder erkannt und eine Verknüpfung von Cd mit den *second messengern*  $\text{Ca}^{2+}$ , NO und ROS postuliert [176]. Auch für SA gibt es Beispiele für eine Zunahme der Konzentration in der Pflanze, vermittelt durch eine Cd-Behandlung. Dabei wurde die gleichzeitig beobachtete Degeneration von Lipiden, welche sowohl mit Cd-Behandlung als auch mit der JA-Produktion assoziiert ist, als Verbindung zwischen Metall und Phytohormon gesehen [166]. In Bur-0 und Col-0 fand sich eine Anreicherung von Cd-regulierten Genen, die mit der Responsivität auf Phytohormone assoziiert werden, vor allem in den Clustern IV und V (welche beide Cd-induzierte Gene enthalten). Darin waren ABA, SA und JA responsive Gene angereichert. Dagegen waren Ethylen responsive Gene ausschließlich in Cluster IV angereichert und Cytokinin responsive Gene ausschließlich in Cluster III (welches Cd-reprimierte Gene enthält). In welcher Form die Phytohormone die Cd-Reaktion vermitteln, ob sie ein Indiz für apoptotische Prozesse in geschädigten Zellen darstellen oder zur Minderung des Schadens, verursacht durch den Cd-Stress, beitragen bleibt zu analysieren.

Neben der genomweiten Analyse der Transkription wurden auch die differenziell regulierten Metallgene geclustert um Unterschiede im Expressionsverhalten unter den Ökotypen zu erfassen (Abb. 30). Dabei konnten einige Cd-Toleranz vermittelnde Gene als responsiv in Bur-0 identifiziert werden. So zum Beispiel ABCC2, ein vakuolärer PC-Cd Transporter, der essenziell für die Cd-Detoxifikation in *A. thaliana* ist [99–101]. Zunächst macht ihn das natürlich zu einem idealen Kandidaten, um den Toleranzunterschied zwischen Bur-0 und Col-0 zu erklären. Da das Gen, welches für den Transporter codiert jedoch nicht in einer der QTL Regionen liegt, führt ein erhöhtes Transkriptlevel in Bur-0 vermutlich nicht zu einer signifikant erhöhten Cd-Toleranz gegenüber Col-0. Der ABCC1 Transporter mit redundanter Funktion ist dagegen in keinem der beiden Ökotypen Cd-responsiv. Für einige Transporter, die bisher weniger gut verstanden sind wie zum Beispiel CHX18, könnte dagegen eine Untersuchung in Bur-0, in welchem das entsprechende Gen stark Cd-responsiv zu sein scheint, eine funktionelle Charakterisierung ermöglichen. Die Induktion von NAS4 in Bur-0 könnte durch Analyse der NA-Gehalte in beiden Ökotypen ergänzt werden. Ergeben sich

unter Cd-Behandlung auch höhere NA-Gehalte in Bur-0 als in Col-0, könnte dies ein Hinweis auf eine Funktion von NA in der Cd-Toleranz sein. Die Rolle von NA in der Fe, Cu, Zn, und Mn Homöostase ist bereits bekannt [183]. Koen *et al.* zeigten 2013 die Relevanz von NAS4 in der Cd-Toleranz durch Analyse von *nas4*-Mutanten [184]. Für den Hyperakkumulator *A. halleri* konnte, vermittelt durch NAS2 dessen Expression unter den 4 NAS Genen in der Wurzel am höchsten ist, zudem ein NA-induzierter Cd-Transport in den Spross nachvollzogen werden [113]. Auch NAS2 ist in Bur-0 und Col-0 Cd-induziert, auch wenn hier nur geringe Unterschiede zwischen den Ökotypen sichtbar sind. Ob NA auch in *A. thaliana* eine Rolle im Cd-Transport zukommt könnte durch Analyse der Cd-Translokation in NA defizienten Mutanten gezeigt werden.

Durch die genomweite Analyse der Genexpression konnten einige Stoffwechselwege in der Cd-Detoxifikation impliziert werden. Dazu gehören eine erhöhte S-Assimilation, so bereits gezeigt in diversen anderen Analysen der Expression nach Cd-Stress bzw. Schwermetallstress im Allgemeinen [85, 147]. Ebenfalls scheint eine Repression des Wachstums durch Veränderungen der Zellwand und des Photosyntheseapparates als Reaktion auf Cd-Behandlung stattzufinden. Dabei sind Phytohormone wie ABA, JA, Ethylen und GA möglicherweise an einer Vermittlung des Cd-Signales beteiligt. Daneben werden jedoch viele weitere Prozesse durch Cd angesprochen. Diese sind entweder bisher komplett unbekannt, oder deren Zusammenhang mit Cd konnte bisher noch nicht gezeigt werden. So gibt es signifikante Regulationsunterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 in Genen welche im Sekundärmetabolismus impliziert sind. Hier könnte eine Analyse des Metabolomes von Bur-0 und Col-0 nach Cd-Behandlung möglicherweise den Zusammenhang einiger Sekundärmetabolite mit Cd herstellen.

Der Vergleich von Bur-0, einem Ökotyp welcher Zn- und Cd-toleranter ist als Col-0, ermöglichte es 4 genomische Regionen zu identifizieren, welche zur erhöhten Cd-Toleranz und, basierend auf der Korrelation der Phänotypen, möglicherweise auch Zn-Toleranz beitragen. Durch genetische Analysen wurde die Region im QTL mit dem höchsten Einfluss auf den Phänotyp auf 292 Kandidatengene eingegrenzt. Unter diesen konnten einige durch

bioinformatische Analysen und Expressionsdaten priorisiert werden. Daneben erlaubte die Microarrayanalyse eine Aussage über die Cd-Antwort in *A. thaliana*. Zukünftig werden durch weitere genetische Eingrenzungen einzelne Kandidatengene selektiert werden können, deren Effekt auf die Cd-Toleranz wird anschließend in Mutanten und transgenen Linien untersucht werden.

## **Teil 2**

**Ursachen der höheren Zinktoleranz des *A. thaliana***

**Ökotyps Cvi-0**

## **1. Einleitung**

Cvi-0 ist ein von den Cap Verde Inseln stammender Ökotyp welcher schon seit Langem für die Erforschung von natürlicher Diversität in *A. thaliana* verwendet wird. Die Cvi-0 X Ler-0 RIL Population gehört zu den ersten, die für *Arabidopsis* etabliert wurden. Die Population wurde 1998 von Alonso-Blanco *et al.* das erste Mal vorgestellt [122]. Die ersten QTL Regionen basierend auf dieser Population, die Variation im Blühverhalten erfassten, wurde im gleichen Jahr vom selben Autor beschrieben [119], eine molekulare Aufklärung des EDI Locus gelang erst 2001. El-Din El-Assal *et al.* konnten dokumentieren, dass die allelische Variation in dem Blaulichtrezeptor CRY2 Ursache für die Variation im Blühverhalten ist [120].

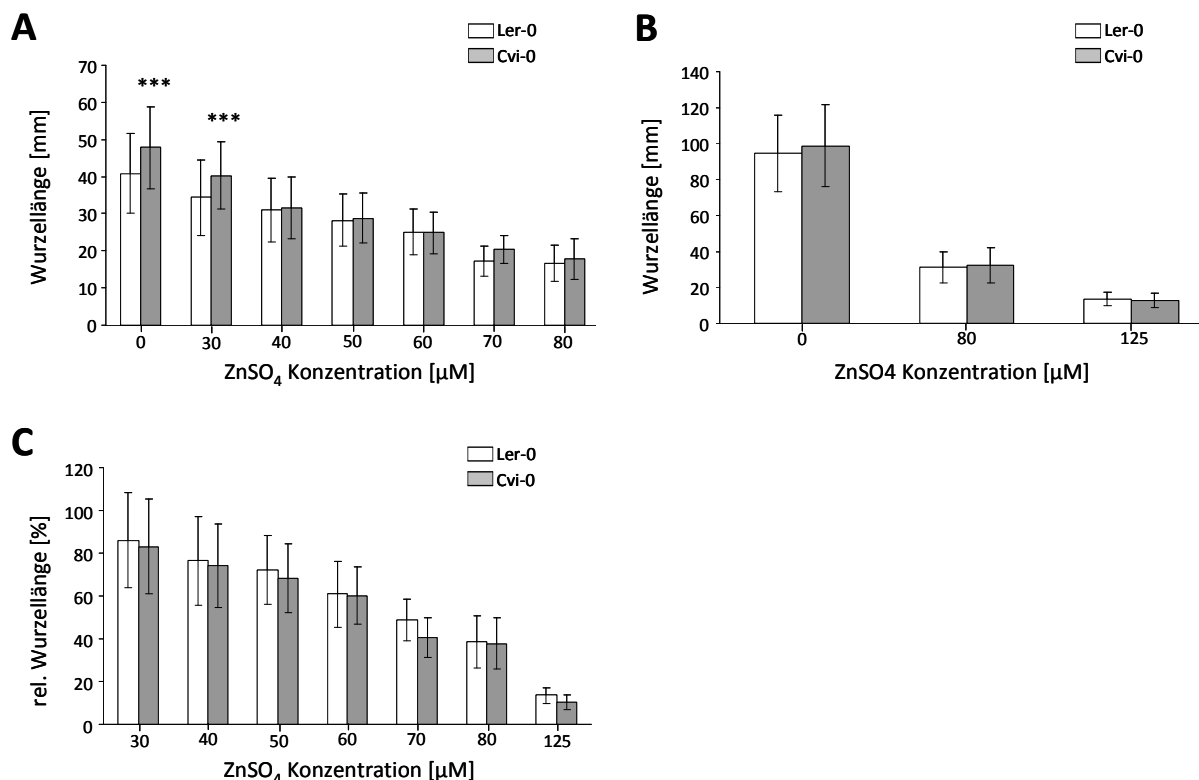
Auch die Aufklärung eines Metallphänotypen mittels QTL Mapping gelang unter Zuhilfenahme dieser Population. Dafür wurde die Cu-Sensitivität von Cvi-0 analysiert [124]. Dabei zeigte sich, dass ein Defekt im HMA5 Cu-Transporter in Cvi-0 zu einer verminderten Translokation von Cu führt, was eine Verringerung der Cu-Toleranz zur Folge hat. Dieser Transporter war bereits zuvor in Verbindung mit Cu-Transport in *A. thaliana* gebracht worden [125].

Außer einer Cu-Sensitivität, zeigt sich Cvi-0 aber Zn-toleranter als Ler-0. Die gleiche Methodik sollte demnach angewandt werden, um der Zn-Toleranz auf die Spur zu kommen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Phänotypisierung von Cvi-0 und Ler-0

Bei der Analyse der Metalltoleranz des von den Cap Verde Inseln stammenden Ökotyps Cvi-0 und des in Zentraldeutschland heimischen Ökotyps Ler-0 fiel die höhere Zn-Toleranz von Cvi-0 auf. Dabei zeigte sich im Standardtoleranztest zunächst kein Unterschied. Beide Ökotypen reagierten auf Zn-Kontaminationen im Medium mit einer Verringerung der Wurzellänge von  $47 \pm 11$  mm für Ler-0 und  $41 \pm 11$  mm für Cvi-0 auf Längen von nur noch  $17.8 \pm 5$  bzw.  $16.6 \pm 5$  mm (Abb. 32 A). Dabei war eine dosisabhängige Reduktion der Wurzellänge zu beobachten.

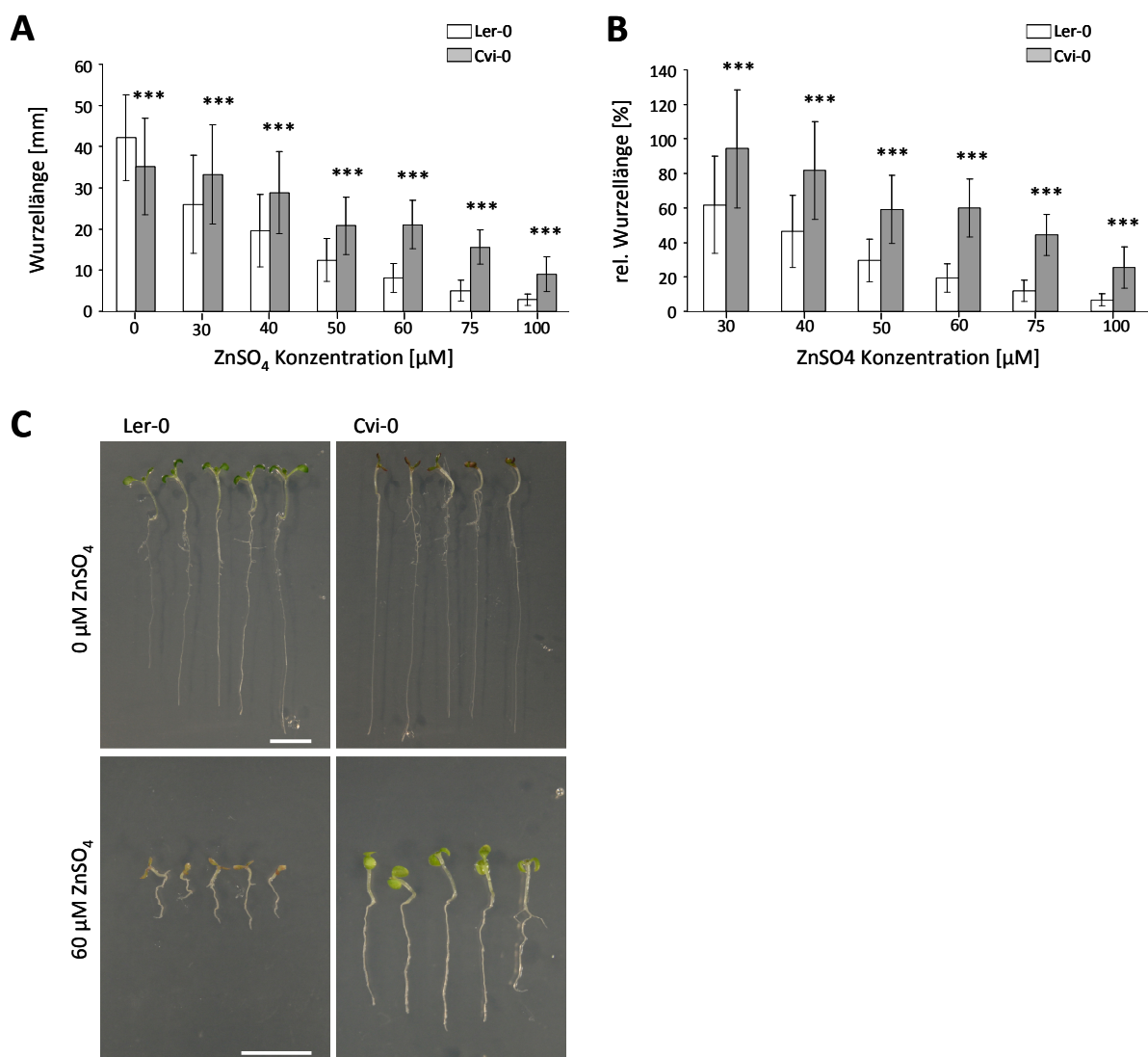


**Abb. 32:** Wurzelwachstum der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Ler-0 und Cvi-0 auf Zn-kontaminiertem, festen Hoagland Medium. **(A)** Wachstum unter Zn-Stress nach 10 Tagen. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von zwei unabhängigen Experimenten mit  $n_{\text{total}} = 66-153$ . **(B)** Wachstum unter Zn-Stress nach 16 Tagen. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten mit  $n_{\text{total}} = 18-93$ . **(C)** Zusammenfassung der relativen Wurzellängen der 5 unabhängigen Experimente. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD mit  $n_{\text{total}} = 18-150$ . Signifikante Unterschiede zwischen Ökotypen wurden mittels zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*\*:  $p < 0,001$ .



Weder durch eine Verlängerung des Wachstumszeitraums auf 16 Tage, noch durch eine Erhöhung des Zn-Stresses auf 125  $\mu\text{M}$ , was zu einer Reduktion des Wachstums auf weniger als 13 mm in beiden Ökotypen führte (Abb. 32 B), konnte der Unterschied in der Toleranz nachgewiesen werden. Die relativen Wurzellängen der beiden Ökotypen wichen nie mehr als 8 % voneinander ab.

Durch die Verwendung eines Flüssigsystems [83] bei welchem dem Medium kein Agar zugesetzt wurde, konnte der bisher maskierte Phänotyp schließlich nachgewiesen werden (Abb. 33).

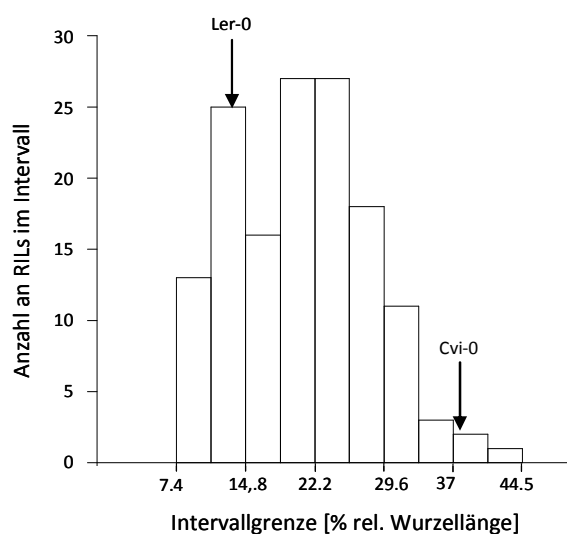


**Abb. 33:** Wurzelwachstum der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Ler-0 und Cvi-0 in flüssigem, Zn-kontaminierten Hoagland Medium. **(A)** Absolutes Wurzelwachstum unter Zn-Stress nach 7 Tagen. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten mit  $n_{\text{total}} = 25-52$ . **(B)** Relatives Wachstum unter Zn-Stress. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten mit  $n_{\text{total}} = 25-52$ . Signifikante Unterschiede zwischen Ökotypen wurden mittels zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*\*:  $p < 0.001$ . **(C)** zeigt 5 Individuen der Ökotypen Ler-0 und Cvi-0 nach 7-tägigem Wachstum in flüssigem, 0 oder 60  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  enthaltendem, Hoagland Medium. Der Maßstab in den Bildern gilt für gleiche Bedingungen und repräsentiert 5 mm.

Unter allen untersuchten Bedingungen unterschied sich das Wurzelwachstum von Cvi-0 signifikant von dem von Ler-0 (Abb. 33 A). Unter Kontrollbedingungen wurde eine Länge von  $42 \pm 10$  mm für Ler-0 und  $35 \pm 12$  mm für Cvi-0 erreicht. Durch die Kontamination mit Zn verringerte sich die Wurzellänge auf bis zu  $2.8 \pm 1$  bzw.  $8.9 \pm 4$  mm. Der generelle Wachstumsunterschied unter Kontrollbedingungen wurde bei der Ermittlung der relativen Wurzellängen als Maß der Zn-Toleranz eliminiert (Abb. 33 B). Auch hier zeigt sich die signifikant höhere Zn-Toleranz von Cvi-0 unter allen getesteten Bedingungen, wobei der größte Unterschied bei einer Konzentration von  $60 \mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  erfasst werden konnte. Neben der Quantifizierung des Phänotyps über die Erfassung der rel. Wurzellänge, überzeugte auch das Erscheinungsbild der Zn-gestressten Individuen (Abb. 33 C). Ler-0 bildete bei Konzentrationen von  $60 \mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  gelb-bräunliche Keimblätter aus, sowie eine stark verkrümmte Wurzel. Cvi-0 Keimlinge schienen dagegen normal entwickelt zu sein, abgesehen von der Reduktion der Wurzellänge gegenüber Kontrollbedingungen.

## 2.2. Mapping der Zinktoleranz von Cvi-0

Die Zn-Toleranz der Cvi-0 X Ler-0 RIL Population [122] wurde unter den zuvor etablierten Versuchsbedingungen erfasst (Abb. 34). In 7 Wachstumsversuchen wurden 143 RILs phänotypisiert und ein rel. Wurzelwachstum von 7 bis 44 % erfasst.



**Abb. 34:** Histogramm zeigt die Verteilung des rel. Wurzelwachstums unter den Ler-0 X Cvi-0 RIL Linien (X Linien). Für Cvi-0 und Ler-0 ist die mittlere rel. Wurzellänge ( $37.3 \pm 6.9\%$  sowie  $13 \pm 3.2\%$ ) in dem Histogramm angezeigt.

Für die Eltern zeigte sich in den 7 Versuchen eine Variation in der Toleranz zwischen 7 – 17 % für Ler-0 und von 28 - 49 % für Cvi-0.

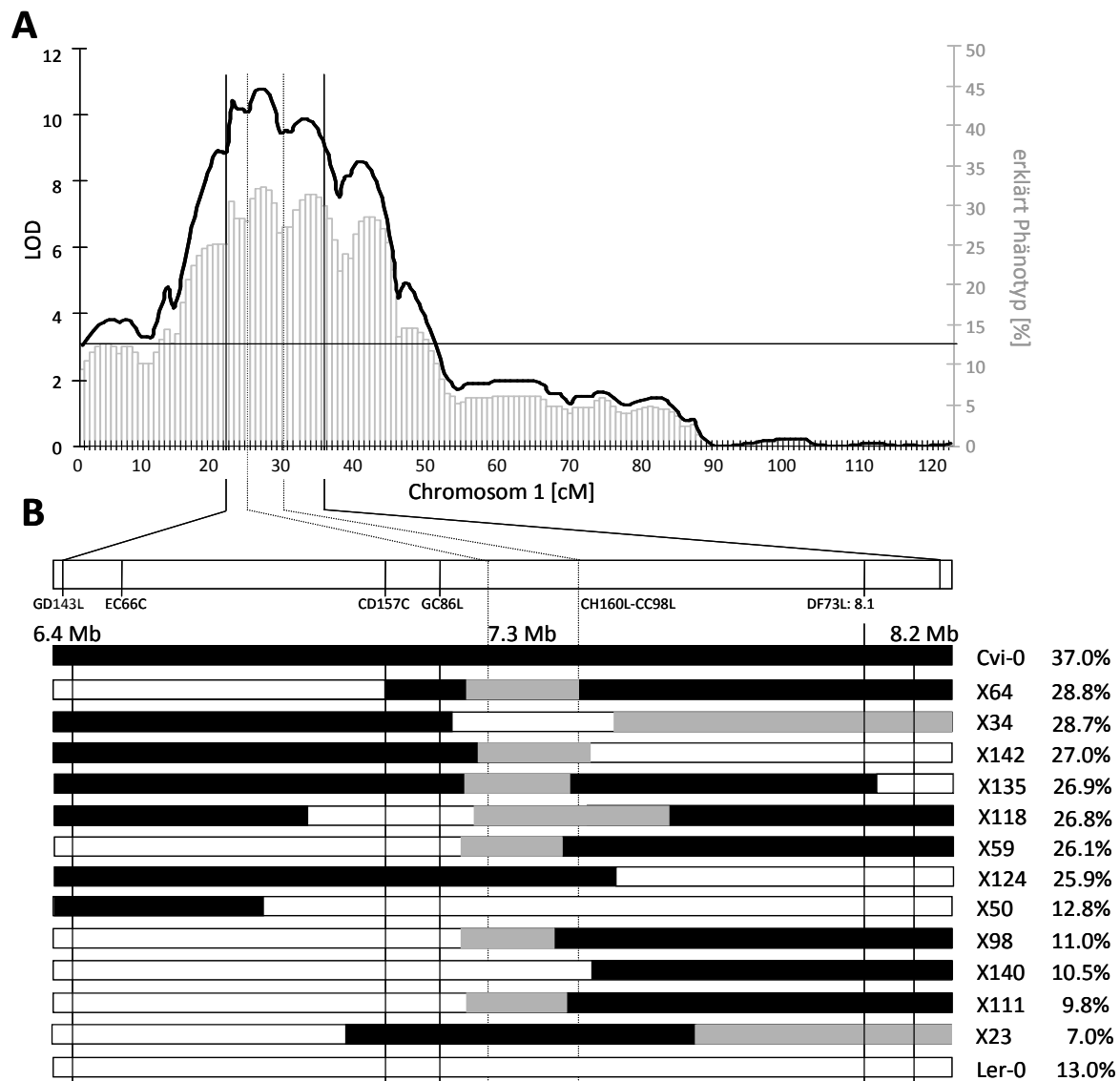
Die relativen Wurzellängen wurden, neben den Informationen welche über den Genotyp der einzelnen RILs vorlagen [122], in das Programm MapQTL5® importiert. Dieses ermittelte die wahrscheinlichste Lokalisation der verantwortlichen Gene im *A. thaliana* Genom (Abb. 35). Die Gene liegen demnach auf Chromosom 1 in einer Region um 30 cM. Die höchsten LOD Werte von >9 wurden dabei von zwei, möglicherweise drei, QTL Regionen erzielt. Diese liegen zwischen den Markern an Position 22 - 24 cM, 25 - 29 cM und 32 - 35 cM. Jede Region erklärt laut Kalkulationen 30 % des erfassten Toleranzunterschiedes.

Nach der Bestimmung der chromosomalen Region wurden einige RILs ausgewählt, welche sich in ihrer Zn-Toleranz deutlich unterschieden und in deren Etablierung es zu einem Rekombinationsereignis in einer dieser Regionen und damit zu einer Kombination von Cvi-0 und Ler-0 Genotypen gekommen war. Der Genotyp dieser 12 RILs wurde in den QTL Regionen zunächst genauer betrachtet. Abb. 35 B zeigt die graphische Veranschaulichung des Genotyps der jeweiligen RIL. Der tatsächliche Übergang vom Genotyp Cvi-0 (schwarz) zum Genotyp Ler-0 ist dabei noch nicht genau bestimmbar. Diese Form der Analyse erklärt jedoch das Zustandekommen von Intervallgrenzen. In Kombination mit der Toleranz der RILs ist dabei eine Verknüpfung bestimmter Regionen in einem Intervall mit dem Phänotyp möglich. Tolerante Linien müssen dabei den Cvi-0 Genotyp in diesem Intervall aufweisen, intolerante Linien dagegen den Ler-0 Genotyp.

Dabei fiel zunächst auf, dass der Marker an Position 7.3 Mb (g2395) welcher die beiden ersten QTL Regionen voneinander abgrenzt für 64 % der RILs nicht ausgewertet wurde (grauer Bereich). Die Errechnung der Abgrenzung dieser beiden QTL Regionen beruht nur auf einem Teil der Phänotypen und ist demnach kritisch zu betrachten. Dieser Sachverhalt wird deutlicher, wenn man die ursprüngliche Markeranalyse der RILs betrachtet (Tab. 18). Die beiden gut bestimmbaren QTL Regionen sind getrennt durch den schlecht charakterisierten Bereich bei Marker g2395 (gelb unterlegt). Dies ist auch graphisch dargestellt durch die grauen (nicht bestimmten) Bereiche in Abb. 35 nach 7.3 Mb.

Nicht jedem der in der ursprünglichen Genotypisierung der RILs verwendeten Marker [122] konnte eine physikalische Position auf Chromosom 1 zugeordnet werden, da es sich um *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) Marker handelt. Für diese wurden die

Rekombinationsfrequenzen und damit der genetische Abstand zueinander ermittelt, sie sind jedoch nicht auf eine genaue genomische Position festlegbar. Die Marker EC66C und CD157C, welche bei 22 und 24 cM liegen, grenzten in den RILs X64 und X34 ein kleineres Intervall in der 1. QTL Region ein. Um die Position der Genotypen in den interessanten RILs besser beschreiben zu können, wurden weitere Marker erstellt.

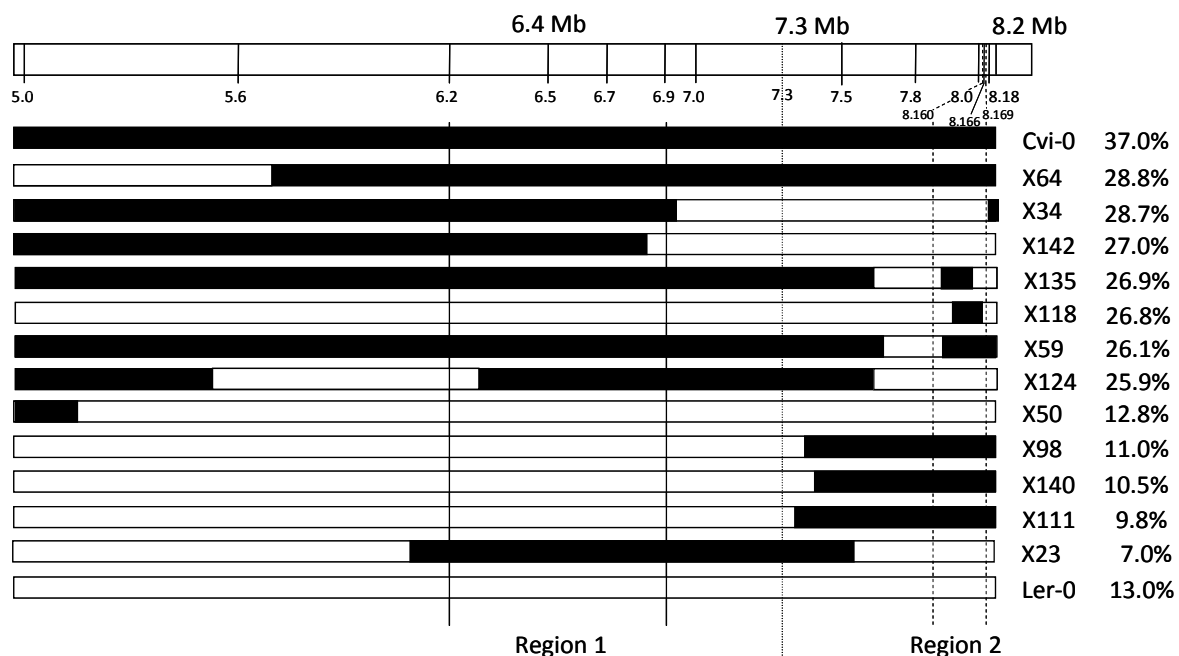


**Abb. 35:** Darstellung der Berechnung der wahrscheinlichen Lokalisierung des für den Cvi-0 Phänotyp verantwortlichen Genes mit dem Programm MapQTL5®. **(A)** zeigt die Wahrscheinlichkeit (LOD) mit der ein chromosomaler Abschnitt ein an der Ausprägung des Zn-Toleranzphänotyp beteiligtes Gen enthält (schwarze Linie, linke Achse). Gleichzeitig ist der Anteil des Phänotyps dargestellt, der durch die jeweilige chromosomale Region erklärt wird (graue Balken, rechte Achse). **(B)** Verteilung der Cvi-0 (schwarz) und Ler-0 (weiß) Allele einiger interessanter RIL Linien (X...) in der QTL Region auf Chromosom 1 (grau: Genotyp nicht bestimmt). Angegeben ist die ursprüngliche Genotypisierung der RILs und die dabei vergebene Markerbezeichnungen (Alonso-Blanco *et al.*, 1998 [122]). Die Position der Marker ist abgeleitet von der Markerkarte erstellt von Alonso-Blanco *et al.*, 1998. In % ist das relative Wachstum der RILs unter Zn-Stress angegeben.

**Tab. 18:** Genotypen der interessanten X RILs in der Region der beiden QTLs auf Chromosom 1. Die physikalische Position (phys. Pos.) der für die Genotypisierung der RILs verwendeten Marker ist soweit bekannt angegeben. Die Toleranz der RILs ist in rel. Wurzellänge in % angegeben. Die beiden QTLs sind durch den Marker g2395 (gelb unterlegt), welcher die schlecht charakterisierte genomische Region am potenziellen dritten QTL markiert (vgl. grauer Bereich in Abb. 35).

Marker	Physik. Pos. [bp]	Position [cM]	Cvi-0 X Ler-0 RIL:											
			X23	X111	X140	X98	X50	X124	X59	X118	X135	X142	X34	X64
*CC120C		22	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	A
*GD143L		22	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	A
*EC66C		22	A	A	A	A	B	B	A	B	B	B	B	A
*CD157C		24	B	A	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B
*GD86L		24	B	A	A	A	A	B	A	A	B	B	B	B
*g2395	7300925	24	B	-	A	-	A	B	-	-	-	-	A	-
*CH160L		30	B	B	B	B	A	A	B	B	B	A	-	B
*DF73L	8166591	31	-	B	B	B	A	A	B	B	A	A	-	B
*CC98L		31	-	B	B	B	A	A	B	B	A	A	-	B
			7.0%	9.8%	10.5%	11.0%	12.8%	25.9%	26.1%	26.8%	26.9%	27.0%	28.7%	28.8%

Es handelte sich um CAPS Marker, deren physikalische Position genau bekannt war. Die CAPS Marker-Analyse der 12 RILs ermöglichte es ein genaueres Bild des Genotypenmosaiks im QTL Bereich zu zeichnen (Abb. 36). 5 CAPS Marker wurden im Bereich von 5 bis 7 Mb in und vor der 1. QTL Region designed und die Genotypen der RILs bestimmt. 6 weitere CAPS Marker dienten zur Genotypisierung der RILs in der 2. Region von 7.5 bis 8.2 Mb.



**Abb. 36:** Genauere Genotypisierung der interessanten X RILs in der QTL Region auf Chromosom 1. Cvi-0 Allele sind in schwarz, Ler-0 Allele in weiß dargestellt. Die Eingrenzung der beiden QTLs durch die vorangegangene Analyse mit dem Programm MapQTL5® ist gekennzeichnet durch die Position der QTL Grenzen mit 6.4 bis 7.3 und 7.3 bis 8.2 Mb. In % angegeben ist die rel. Wurzellänge der RILs unter Zn-Stress. Regionen mit Kandidatengenen, welche durch die Genotypisierung eingegrenzt wurden, sind gekennzeichnet.

Die positionsgenaue Beschreibung der Genotypen in Tab. 19 verdeutlicht, was bereits in Abb. 36 auffiel. Für die 1. Region sind die RILs X64 und X34 geeignet um das Intervall auf 5.6 bis 7.0 Mb einzugrenzen. Weitere CAPS Marker verkleinerten das Intervall mit Hilfe der RILs X64 und X142 auf 5.6 bis 6.9 Mb (Abb. 36, Tab. 19). Zudem weist die Linie X124 einen noch kleineren Bereich an Cvi-0 Allelen auf. Dieser erstreckt sich zwischen dem CAPS Marker an Position 6.2 und verläuft bis in Region 2 definiert von dem Marker an Position 7.5. X124 ist weniger tolerant als X142 oder X64, welche bis dahin das kleinste Intervall in Region 1 eingrenzen. Dennoch ist sie mit einem Wachstum von 26 % deutlich toleranter als Ler-0. Eine weitere Eingrenzung auf die Region von 6.2 bis 6.9 Mb ist demnach eventuell möglich. Um diese weitere Eingrenzung zu bestätigen und auch um das Intervall an Cvi-0 Allelen in einer Zn-toleranten Linie weiter zu verkleinern, war das Kreuzen einer X Linie erforderlich (vgl. Abschnitt: 2.2.1. Eingrenzung der Region 1). Die Analyse der Genome nach Position 7.3 Mb ließ nicht den Schluss auf zwei voneinander abgegrenzte QTL Regionen zu. Linie X118 welche mit 26.8 % eine gute Zn-Toleranz ähnlich der von Cvi-0 aufwies, enthielt nur in einem sehr kleinem Intervall in Region 2 Cvi-0 Allele, welche an der Ausprägung des Cvi-0-ähnlichen Phänotyps beteiligt sein können. In Region 1 enthielt diese Linie ausschließlich Ler-0 Allele, womit Region 1 in X118 keinen Beitrag zur Zn-Toleranz leisten können sollte. X118 wurde deshalb zur Eingrenzung der Kandidatengen in Region 2 herangezogen (2.2.2. Region 2).

**Tab. 19:** Genauere Genotypisierung der interessanten X RILs in den QTL Regionen auf Chr. 1. Neu designte (ND) Marker, deren genaue physikalische Position angegeben ist, wurden für die Charakterisierung der RILs verwendet. Die beiden QTLs sind durch den gelb unterlegten Marker g2395 voneinander getrennt. Die Toleranz der RILs ist als rel. Wurzellänge in % angegeben. A: Ler-0 Genotyp, B: Cvi-0 Genotyp

Marker	Physik. Pos. [bp]	Position [cM]	Cvi-0 X Ler-0 RIL:											
			X23	X111	X140	X98	X50	X124	X59	X118	X135	X142	X34	X64
ND	5000072		A	A	A	A	B	B	B	A	B	B	B	A
ND	5646330			A		A			B		B	B	B	A
ND	6278745		B	A	A	A	A	A	B	A	B	B	B	B
ND	6546667	22						B		A	B	B		
ND	6781124							B		A	B	B		
ND	6931041		B	A	A	A	A	B	B	A	B	A	B	B
ND	7053333							B		A	B	A		
*g2395	7300925	24	B	-	A	-	A	B	-	-	-	-	A	-
ND	7575417		B	B	B	B	A	B	B	A	B	A	A	B
ND	7871352									A		A		
ND	8017946									A				
ND	8160779							A		A	A	A		
*DF73L	8166591	31	-	B	B	B	A	A	B	B	A	A	-	B
ND	8169216							A		A	A	A		
ND	8182338		A	B	B	B	A	A	B	A	A	A	B	B
			7.0%	9.8%	10.5%	11.0%	12.8%	25.9%	26.1%	26.8%	26.9%	27.0%	28.7%	28.8%

### 2.2.1. Eingrenzung der Region 1

Für die weitere Eingrenzung des 0.6 Mb großen Intervalls wurde die Linie X124 mit Ler-0 gekreuzt. Diese RIL ist mit 27 % rel. Wurzelwachstum Zn-toleranter als Ler-0. In der 2. QTL Region wurden für diese Linie Ler-0 Allele detektiert [122], so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Zn-Toleranz von X124 ausschließlich durch die QTL Region 1 vermittelt wird. In dieser Region wurden Cvi-0 Allele ab mindestens 6.5 Mb und bis mindestens 7.5 Mb sowie Ler-0 Allele ab mindestens 5.6 bis 6.2 Mb erfasst (Abb. 36, Tab. 19). Die Identität der Region um Marker 6.2 Mb wurde zudem durch eine Sequenzierung überprüft (Anhang Abb. 1). Sequenziert wurde X124 direkt oberhalb des Bereiches welcher durch die CAPS Markeranalyse als Ler-0 identifiziert wurde und aufgrund dessen die Eingrenzung der Region vorgenommen wurde. Dabei konnte ein wechselnder Genotyp der RIL mit zunächst Ler-0 typischen SNPs, dann Cvi-0 typischen SNPs und dann wieder Ler-0 SNPs gezeigt werden. Zudem wurde eine Insertion sichtbar, wie sie weder in der Cvi-0 noch in der Ler-0 Referenzsequenz auftaucht [185]. In der zweiten sequenzierten Region in X124 konnte anfänglich ein Cvi-0-Genotyp, welcher schließlich zu Ler-0 umschlägt, identifiziert werden. Die Sequenzierung der Regionen zeigte damit, dass ein komplexeres Mosaik an Cvi-0 und Ler-0 Allelen entstanden war, als die ursprüngliche Genotypisierung gezeigt hatte [122]. Gleichzeitig war die Schlussfolgerung möglich, dass Ler-0 Allele in der toleranten X124 in dieser Region vorhanden sind. Damit ist die obere Eingrenzung des Intervalls mit Hilfe dieser RIL möglich.

Durch das Kreuzen von X124 mit Col-0 konnte in der 2. Tochtergeneration (Z Linien) nach Rekombinationsereignissen in dem Bereich zwischen 6.2 und 6.5 Mb gesucht werden. Eine erneute Korrelation der Zn-Toleranz dieser Nachkommen mit deren Genotyp in dem Intervall kann zu einer Eingrenzung des relevanten Bereiches führen.

In Tab. 20 ist der Genotyp und Zn-Phänotyp von 13 Z Linien sowie der Elternlinie X124 dargestellt. 11 CAPS Marker zwischen 6.2 und 7.3 Mb dienten der Genotypisierung. In einigen Fällen war eine Unterscheidung zwischen dem homozygoten Genotyp Cvi-0/Cvi-0 und dem heterozygoten Genotyp Cvi-0/Ler-0 nicht möglich. Es zeigte sich, dass tolerantere Z Linien in dem untersuchten Intervall zumindest ein Cvi-0 Allel trugen, intolerantere dagegen homozygot Ler-0-Allele aufwiesen. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass sich das Gen verantwortlich für den Zn-Toleranz Phänotyp in diesem Intervall befinden muss.

**Tab. 20:** Genotypisierung der Linien entstanden aus der F2 einer Kreuzung der RIL X124 mit Ler-0 (Z Linien), zur Eingrenzung des oberen QTLs auf Chromosom 1. A: Ler-0 Genotyp, B: Cvi-0 Genotyp. Die Toleranz der Linien ist als rel. Wurzellänge in % angegeben. Es wurden neu designten (ND) Marker verwendet deren genaue physikalische Position (phys. Pos.) angegeben ist.

\*: H nicht von B unterscheidbar

Marker	Physik. Pos. [bp]	Position [cM]	F2 Generation einer Kreuzung der RIL X124 und Ler-0 :													
			X124	Z78	Z2	Z87	Z48	Z35	Z45	Z10	Z40	Z30	Z20	Z4	Z33	Z25
ND	6278745		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ND	6352420		B	H/B	B	B	H	H/B		H		?	A		A	A
ND	6429517		B	H/B	B	B	H	H/B		H		H	A		A	A
ND*	6476528		B	H/B	B	B	H	H/B		H		H	A		A	A
ND	6546667	22	B	B	B	B	H	B	H	H	A	H	A	H	H	B
ND	6584898		B	H	B	B	H			H		H	A		A	A
ND	6623129		B	H	B	B	H			H		H	A	A	A	A
ND	6702736		B	H	B	B	H	H		H	A	H	H	A	A	A
ND	6781124		B	H	B	B	H	H	H	H	A	H	H	A	A	A
ND	6862997		B													
ND	6912023		B													
ND	6931041		B	A	H	H?	H	H	A	A	H	H	H	A	A	A
*g2395	7300925		B													
			27.9	26.9	26.1	24.8	23.6	23.4	22.4	21.8	21.3	20.5	19.9	19.4	19.3	19.2
			±4%	±1%	±0%	±5%	±2%	±3%	±4%	±3%	±4%	±7%	±1%	±2%	±2%	±2%

Des Weiteren wurden an Position 6.9 in 50 % der analysierten Z Linien homozygote Ler-0-Allele gefunden, in 50 % der Fälle der heterozygote Genotyp, niemals jedoch homozygote Cvi-0 Allele. Dies bestätigt erneut die obere Grenze des relevanten Intervalls bei 6.9 Mb. Die Nachkommen der Linie Z30 wurden auf die Aufspaltung ihres Phäno- und Genotyps hin untersucht (Tab. 21).

**Tab. 21:** Genotypisierung der Nachkommen der Linie Z30, zur Eingrenzung des oberen QTLs auf Chromosom 1. A: Ler-0 Genotyp, B: Cvi-0 Genotyp. Die Toleranz der Linien ist als rel. Wurzellänge in % angegeben. Es wurden neu designten (ND) Marker verwendet deren genaue physikalische Position (phys. Pos.) angegeben ist.

Marker	Physik. Pos. [bp]	Position [cM]	Aufspaltung der Linie Z30 (F2 Nachkomme der Kreuzung X124 x Ler-0)										
			X124	Z30.4	Z30.10	Z30.9	Z30.3	Z30.6	Z30.7	Z30.1	Z30.8	Z30.5	Z30.2
ND	5646330												
ND	6278745		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
ND	6353364			B	A	B		H	H	H		B	A
ND	6458300			B	H	B		B			H	A	
ND	6475261			B	H	B	B	H	H	H	H	A	A
ND	6546667	22	B	B	H	B	H	H	H/B	H	H	A	A
ND	6584898			B/A	H	H	H	H		B	H	A	A
ND	6623129			B	H	B	H	H	H	H	H	A	A
ND	6702736												
ND	6781124		B	B	B(?)	B(?)	H	H/B	H		H		B/A
ND	6931041		B	B	H (?)		H	H	A(?)		A(?)		A
ND	7053333		B	B			A						A
*g2395	7300925		B										
			27.9	28.5	28.2	27.7	25.5	25.0	23.6	21.2	20.8	20.1	19.4
			±4%	±8%	±8%	±10%	±6%	±8%	±3%	±2%	±4%	±7%	±6%



Auch hier zeigte sich eine positive Korrelation des homozygoten Cvi-0 Genotyps in dem Intervall von 6.2 bis 6.9 Mb mit einer guten Zn-Toleranz. Ein Rekombinationsereignis, welches eine Eingrenzung des Bereiches erlaubt hätte, konnte jedoch nicht gefunden werden. Das Intervall für Region 1, welche sich laut MapQTL5<sup>®</sup> von 22 bis 25 cM erstreckt, ist somit begrenzt auf 6.3 bis 6.9 Mb. Dieser 600000 bp große Bereich enthielt 196 Gene (von At1G18230 bis At1G19970).

Um die Anzahl an Genen zu reduzieren, welche für die Ausprägung des Phänotyps in Frage kommen, wurden publizierte Microarraydaten analysiert. Gene welche nachweislich durch erhöhte Zn-Konzentrationen in ihrer Regulation verändert werden, sind möglicherweise auch an der Ausprägung eines Toleranzunterschiedes beteiligt, insofern die Regulation in den beiden Ökotypen unterschiedlich erfolgt. Drei Datensets wurden nach Zn-responsiven Genen durchsucht, welche sich im eingegrenzten Intervall befinden: Becher *et al.* 2004, Talke *et al.* 2006, Mortel *et al.* 2006 [151, 164, 165]. Drei Gene aus dem Intervall von 6.3 bis 6.9 Mb zeigen eine Induktion der Expression durch erhöhte Zn-Konzentrationen im Wachstumsmedium (Tab. 22). Neben einer Variation in der Expression kann eine abweichende Proteinfunktion durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz entstehen. Gene mit Nukleotidaustauschen, welche zu einem Aminosäureaustausch führen wurden selektiert [185]. Anschließend wurde eine SIFT Analyse [142] der betroffenen Proteine durchgeführt. Basierend auf Sequenzhomologien werden dabei konservierte Aminosäuren detektiert. Sind diese nun von einem Aminosäureaustausch in einem der beiden Ökotypen betroffen, werden sie durch die Analyse klassifiziert. Gene deren Produkte in einem der beiden Ökotypen als „Nicht Funktional“ bewertete Aminosäuren enthielten wurden in die Liste der Kandidatengene aufgenommen. Durch die Analyse der Kandidatengene mit bioinformatischen Methoden und durch die Erfassung des Expressionsverhaltens unter Zn-Stress konnten 16 der Kandidatengene priorisiert werden (Tab. 22). Für diese werden zukünftige Analysen von *knock-out* Linien ermitteln, ob sie Zn-toleranzrelevant sind.

Aufgrund einer zwischenzeitlichen Festlegung von Intervallen durch Markeranalysen, die sich in späteren Untersuchungen als weniger zuverlässig herausstellten, wurden Kandidaten für eine Komplementation ausgewählt. Diese Gene: At1G18485, At1G18810, At1G18960 und At1G19520 lagen in den eingegrenzten Regionen und enthielten zudem nicht tolerierte AS-Austausche in Ler-0. Für das Gen At1G18960 konnte festgestellt werden, dass es außerdem eine von dem SIFT Algorithmus nicht tolerierte „original“ AS, das heißt in einer AS welche

auch durch die Referenzsequenz von Col-0 codiert wird, enthält. Bei weiteren SIFT Analysen (von Proteinen deren Gene in anderen bzw. erweiterten Kandidatenregionen liegen) wurden Gene ausgeschlossen für die eine nicht tolerierte „original“ AS vorhergesagt wurde. At1G18960<sub>Cvi-0</sub> wurde jedoch analysiert. Dadurch sollte das Prinzip der Auswahl von Kandidatengenen mit der SIFT Analyse bestätigt werden. Erwartet wurde ein nicht funktionales Genprodukt in Cvi-0, auch wenn kein nicht tolerierter AS Austausch in diesem Ökotyp vorliegt.

**Tab. 22:** Liste der Kandidatengene in Region 1 auf Chromosom 1 zwischen 6.3 und 6.9 Mb. Kandidatengene wurden ermittelt durch SIFT Analysen sowie unter Einbeziehung bereits veröffentlichter Microarrayanalysen [151, 164, 165]. 4 der Gene wurden als Kandidaten für eine Komplementation des Phänotyps ausgewählt: At1G18485, At1G18810, At1G18960 und At1G19520.

AGI	Beschreibung	Zn Induzierbar	GI	Anzahl der Unterschiede in der AS Sequenz zwischen Ler-0 und Cvi-0	nicht funktionale AS in Cvi-0 (Nr.)	nicht funktionale AS in Ler-0 (Nr.)	AS Position in beiden Ökotypen nicht funktional
AT1G18485	Pentatricopeptide (PPR) repeat Protein	-	332191599	1	-	596	-
AT1G18750	AGL65, Transkriptionsfaktor	-	332191637	1	389	-	-
AT1G18810	Phytochromkinase Substrat	-	332191645	Deletion	-	2 AA deletiert	-
AT1G19070	F-box Protein	-	332191678	Deletion	-	6 AA deletion (am Start)	-
At1G19140	unbekanntes Protein	2.7fach (Becher et al.)	332191688	-	-	-	-
AT1G19380	unbekanntes Protein	-	332191720	2	-	14	-
AT1G19410	F-box fähnliches Protein	-	332191729	21 und 2 AA deletiert	-	Deletionen	-
AT1G19470	Kelch repeat enthaltendes F-box Protein	-	332191734	17 und 2 AA deletiert	-	Deletion	-
AT1G19485	AT hook Motiv enthaltendes Protein	-	332191738	2	-	3	-
AT1G19520	NFD5 (NUCLEAR FUSION DEFECTIVE 5) Transkriptionsfaktor	-	332191742	1	-	78	-
AT1G19620	unbekanntes Protein	-	332191753	6	-	53, 258	-
AT1G19860	Zn Finger (CCCH-typ) Protein	2.0fach (Talke et al.)	332191786	1	-	-	-
AT1G19250	FMO1, Pathogenresistenz durch TIR-NB-LRR	1.9fach (Talke et al.) / 2-4fach (Mortel et al.)	332191702	-	-	-	-
AT1G19260	Protein mit hAT Dimerisierungsdomäne	-	332191703	1 und Deletionen	-	Deletionen	-
AT1G19340	Methyltransferase MT-A70 Protein	-	332191712	4	17	-	-
AT1G19430	Dehydration-responsives Protein	-	332191730	3	98	-	-
AT1G19650	SEC14 cytosolischer Factor, Phosphoglyceridtransfer Protein	-	332191756	2	41	-	-
AT1G18960	myb Transkriptionsfaktor	-	332191663	1		201	67, 83

Die 4 Gene At1G18485, At1G18810, At1G18960 und At1G19520 (3 Kandidaten und 1 negativ Kontrolle) wurden aus Cvi-0 amplifiziert und, zusammen mit der umgebenden genomischen Region, in Ler-0 transferiert. Zu einem späteren Zeitpunkt stellten sich einige der verwendeten Marker als nicht verlässlich heraus. Analysen wurden wiederholt, neue Marker wurden designed und ein der RILs in welcher auch durch eine Sequenzierung keine eindeutige Bestimmung des Alles erfolgen konnte wurde aus der genetischen Analyse der QTL Region ausgeschlossen. Dadurch wurde das Intervall auf die Region von 6.3 bis 6.9 Mb erweitert und enthält nun noch 14 weitere Gene (Tab. 22) auf welche die oben beschriebenen Kriterien eines Kandidatengens zutreffen würden. Sollte keines der drei Kandidatengene zur Zn-Toleranz beitragen, müssten weitere Kandidatengene des Intervalls von 6.3 bis 6.9 Mb untersucht werden.

At1G18485 enthält unter 5 AS Unterschieden zwischen Ler-0 und Cvi-0 in Ler-0 eine nicht funktionale AS an Position 596. Diese führt möglicherweise zu einem Funktionsunterschied. At1G18485 ist annotiert als *pentatricopeptide (PPR) repeat* enthaltendes Protein. Das zweite Gen At1G18810 weist in Ler-0 eine Deletion auf die zur Verkürzung des Proteins um 2 AS gegenüber dem Protein von Cvi-0 führt. Dies könnte, neben einem nicht-tolerierbaren AS-Austausch, ebenfalls die Funktion verändern. Das Kontrollgen At1G18960 weist in beiden Ökotypen AS an Position 76 und 83 im Protein auf, welche laut SIFT Analyse als nicht toleriert eingestuft wurden. Zudem ist die AS an Position 201 in Ler-0 nicht toleriert. At1G18960 gehört zu einer Familie an Transkriptionsfaktoren die Myb-ähnlich sind (PF13921). Das vierte Kandidatengen At1G19520 enthält nur einen Sequenzunterschied zwischen Cvi-0 und Ler-0, dieser führt zu einer nicht tolerierten Aminosäure an Position 78 im Ler-0 Protein. Bei dem Protein handelt es sich, wie auch bei At1G18584, um eines der *Pentatricopeptid-repeat* Familie (PF01535). At1G19520 wird auch als NFD5: *Nuclear Fusion Defective 5*, bezeichnet.

Die Gene wurden in den Vektor pMDC123 kloniert. Dabei wurde neben der genomischen Sequenz auch ein ca. 1.5 kb großer Abschnitt vor und nach der codierenden Region amplifiziert (für At1G18485 nur noch eine Region von 409 bp nach dem Stop Codon, damit ergab sich bereits ein Fragment von 5 kb). Die flankierenden Regionen enthalten neben den 5' und 3' *untranslated regions* (UTRs) auch regulatorische Cis Elemente. Für At1G18485 wurden 4 CIS Elemente bis 25 bp vor dem Start Codon vorhergesagt, bei At1G18810 soll ein CIS Element 207 bp vor dem Start Codon liegen, At1G18960 hat nach der

Computervorhersage zwei CIS Elemente (CTATAA und TATAAAC) 40 und 39 bp vom ATG entfernt und At1G19520 eines (TTGACTT) 119 bp vor dem Start (Analyse der CIS Elemente mit der ATTED-II Datenbank Version 7.1 [186]). Mit Hilfe von *A. tumefaciens* wurden Ler-0 Individuen mit den genomischen Konstrukten transformiert. Die At1G18485<sub>Cvi-0</sub>, At1G18810<sub>Cvi-0</sub>, At1G18960<sub>Cvi-0</sub> oder At1G19520<sub>Cvi-0</sub> enthaltenden transgenen Ler-0 Linien wurden auf ihre Zn-Toleranz hin untersucht. Unterschiede in der Toleranz zwischen Ler-0 und den transgenen Ler-0 Linien würden auf einen Effekt eines Kandidatengens auf die Zn-Toleranz hinweisen. (vgl. Abschnitt: 2.2.3. Komplementation der Zn-Sensitivität von Ler-0 durch Cvi-0 Gene)

### 2.2.2. Region 2

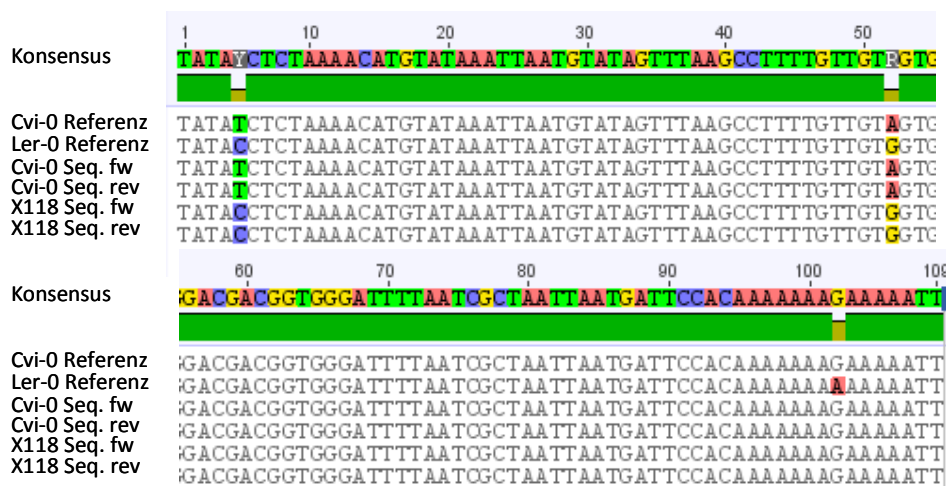
Die zweite QTL Region konnte auf einen Bereich von 7.5 bis 8.2 Mb definiert werden. Die Charakterisierung einiger X Linien mit 6 neu designten CAPS Markern verdeutlichte, dass die Zn-tolerante Linie X118 das verantwortliche Cvi-0 Gen in einer Region von 8.16 bis 8.169 Mb enthalten musste (Tab. 23).

**Tab. 23:** Genauere Genotypisierung der RIL X118 in den QTL Regionen. Neu designte (ND) Marker, deren genaue physikalische Position angegeben ist, wurden für die Charakterisierung verwendet. Die beiden QTLs sind durch den gelb unterlegten Marker g2395 voneinander getrennt. Die Toleranz der RIL ist als rel. Wurzellänge in % angegeben. A: Ler-0 Genotyp, B: Cvi-0 Genotyp

Marker	Physik. Pos. [bp]	Cvi-0 X Ler-0 RIL:	
		Position [cM]	X118
ND	5000072		A
ND	5646330		
ND	6278745		A
ND	6546667	22	A
ND	6781124		A
ND	6931041		A
ND	7053333		A
*g2395	7300925	24	-
ND	7575417		A
ND	7871352		A
ND	8017946		A
ND	8160779		A
*DF73L	8166591	31	B
ND	8169216		A
ND	8182338		A
			26.8±4%

Neben der Analyse des Genotyps der Linie X118 wurde diese Hypothese auch gestützt von der Verteilung der Genotypen in Linie X135 und X59 (Abb. 36, Tab. 19 in Abschnitt 2.2. Mapping der Zinktoleranz von Cvi-0). Bei diesen handelt es sich ebenfalls um tolerante Linien welche Cvi-0 Allele in diesem Bereich enthalten.

Der Genotyp der Linie X118 in dem 3kb großen Bereich wurde durch eine Sequenzierung überprüft. An Position 8164600 und 8164612 finden sich Abweichungen in der Cvi-0 Sequenz zu der in der 1001 *genomes* Datenbank angegebenen [185]. Diese wurden für das Alignment, zur Verdeutlichung der Sequenzunterschiede zwischen Cvi-0 und Ler-0, aus der Cvi-0 Referenzsequenz entfernt (Abb. 37). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass in der RIL X118 in dem Bereich bis 8164560 bp SNPs zu detektierbar sind, welche dem Ökotyp Ler-0 zugeordnet werden können. Durch die Sequenzierung konnte das Vorhandensein von Cvi-0 Allelen in X118 nach der Position 8164600 bestätigt werden.

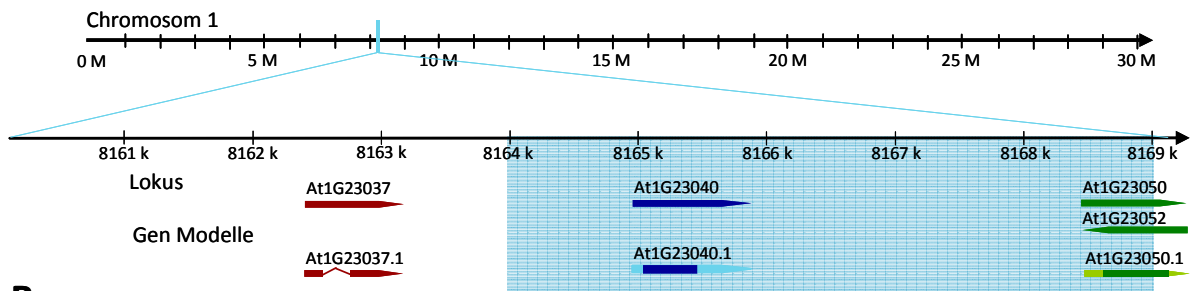


**Abb. 37:** Sequenzalignment von Cvi-0 und Ler-0 in der Region 8164509 bis 8164623 bp auf Chromosom 1 nach der 1001 *genomes* Datenbank [185] sowie der Sequenzierung von Cvi-0 und x118 in dieser Region. Aus der Referenzsequenz wurden 2 Insertionen (5 Basen) entfernt, welche nicht durch die Sequenzierung von Cvi-0 bestätigt werden konnten, sondern offenbar auf einem fehlerhaften Alignment basieren. Die Konsensussequenz ist grün unterlegt. Abweichungen sind in der Konsensussequenz braun markiert und in den einzelnen Sequenzen farbig unterlegt.

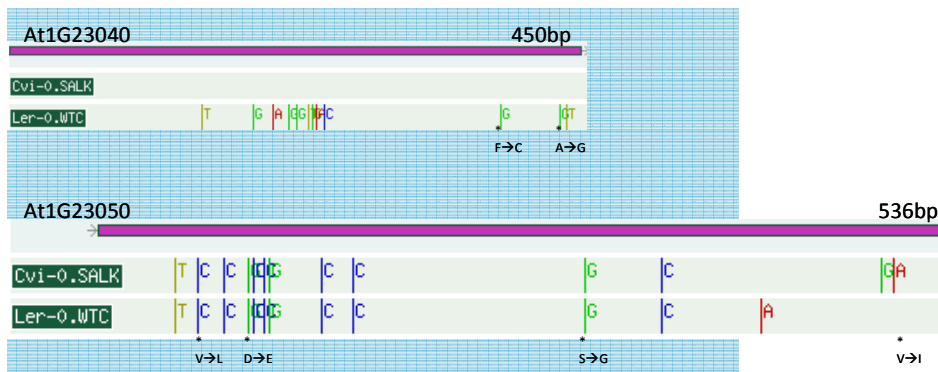
Durch die Kombination der Genotypisierung von X118 sowie der CAPS Markeranalyse an Position 8166591 durch Alonso-Blanco *et al.* 1998 [122], konnte die Mapping-relevante Region auf den Bereich von 8.1646 bis 8.169 Mb eingegrenzt werden. In diesem Bereich liegen 2 Gene. Abb. 38 verdeutlicht die Lage der Gene At1G23040 und At1G23050 im blau unterlegten, gemappten Intervall. Das Gen mit der geringsten Entfernung zur eingegrenzten Region war At1g23037. Dieses liegt 1 kb von der Rekombinationsstelle bei 8.164 Mb

entfernt. Aus diesem Grund wurde es als Kandidatengen ausgeschlossen, da vermutlich auch die Regulation der Ler-0 Gens At1G23037 in X118 nicht mehr durch Cvi-0-genotypische Regionen beeinflusst werden kann.

**A**



**B**



**Abb. 38:** Analyse der QTL Region 2 auf Chromosom 1. **(A)** Schematische Darstellung der genomischen Region von *A. thaliana* von 8160779 bp bis 8169000 bp nach Tair [187]. Darin liegen die Gene At1G23037, At1G23040 und At1G23050. Das Intervall welches Kandidatengene enthält ist blau hinterlegt. **(B)** At1G23040 und At1G23050 Varianten in den Ökotypen Cvi-0 und Ler-0 [185]. Nukleotidaustausche sind farblich markiert. rot: Substitution zu Adenin, Substitution zu: gelb: Thymin, blau Cytosin, grün: Guanin. Zu Aminosäureaustauschen führende SNPs sind mit \* gekennzeichnet und die jeweilige Veränderung in der AS Sequenz ist angegeben. Das gemappte Intervall an Cvi-0 Allelen in X118 ist blau hinterlegt.

Die Analyse der Sequenz der beiden Kandidatengene (schematisch dargestellt in Abb. 38 B) zeigte für At1G23040 mehrere Nukleotidaustausche zwischen Ler-0 und Cvi-0. Zwei dieser Ler-0-spezifischen SNPs führen zu Aminosäureaustauschen. Daneben ist auch die umgebende Region von At1G23040 stark unterschiedlich in den beiden Ökotypen. Für At1G23050 können dagegen nur Sequenzunterschiede zwischen Ler-0 und Cvi-0 in der Region außerhalb des gemappten Intervalls gefunden werden. Es wurde aus diesem Grund als Kandidatengen ausgeschlossen.

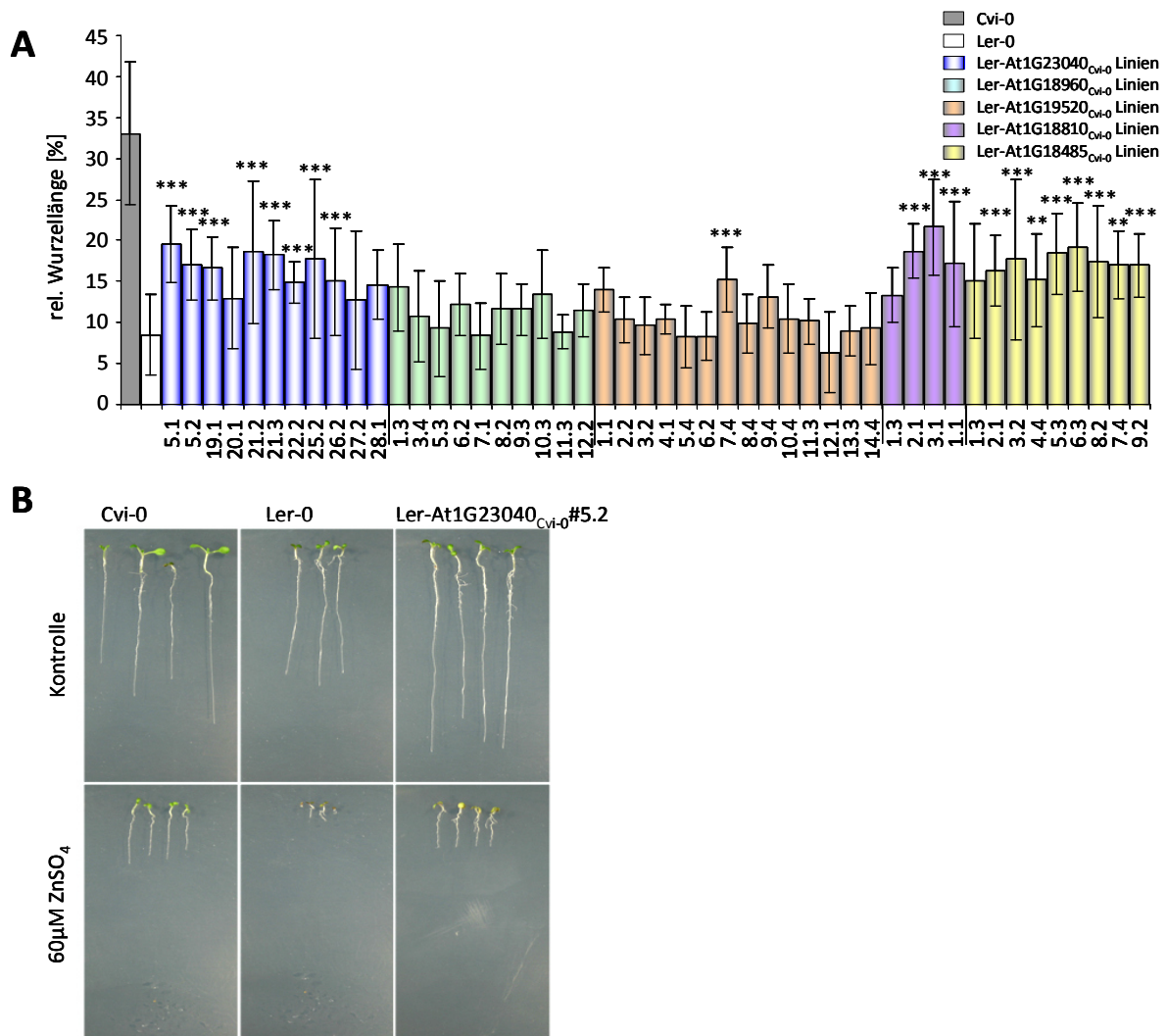
Das 435 bp große Exon des Gens At1G23040<sub>Cvi-0</sub> wurde zusammen mit den flankierenden genomischen Regionen von 1700 und 881 bp am 3' und 5' Ende in den Vektor pMDC123 transformiert. Damit sind Cis regulatorische Elemente enthalten (157 bp vor dem ATG, nach

ATTED-II Vers. 7.1 [186]) [188]. Diese könnten Einfluss auf die Ökotyp-spezifische Expression haben, welche für die Zn-Toleranz ausschlaggebend sein kann. Nach Infiltration von Ler-0 Individuen mit *A. tumefaciens*, welche mit dem At1G2304<sub>Cvi-0</sub> enthaltendem Gateway® Plasmid transformiert wurden, konnten transgene Linien durch Selektion von Basta®-resistenter Individuen über 2 Generationen hinweg etabliert werden. Die Zn-Toleranz dieser transgenen Linien gibt Aufschluss darüber, ob das Gen At1G23040 tatsächlich für die Zn-Toleranz von Cvi-0 mitverantwortlich ist.

### 2.2.3. Komplementation der Zn-Sensitivität von Ler-0 durch Cvi-0 Gene

Transgene Ler-0 Linien, welche jeweils eines der Kandidatengene enthielten, wurden auf ihre Zn-Toleranz hin analysiert. In Abb. 39 A ist das Wurzelwachstum von Cvi-0 und Ler-0 sowie der Transgenen erfasst. 7 von 9 Linien, welche das Gen At1G23040<sub>Cvi-0</sub> enthalten, zeigten dabei ein besseres Wurzelwachstum als Ler-0 und komplementieren damit die Zn-Sensitivität des Wildtyps. Abb. 39 B zeigt 4 Individuen einer der transgenen Linien. Deutlich ist dabei das bessere Wachstum im Vergleich zu Ler-0 zu erkennen. Von den drei Kandidatengenen der zweiten QTL Region komplementierten zwei den Zn-sensitiven Ler-0 Phänotyp partiell. 3 von 4 transgenen Linien welche At1G18810<sub>Cvi-0</sub> enthalten und 7 von 8 welche At1G18485<sub>Cvi-0</sub> enthalten wiesen ein signifikant besseres Wachstum auf als der Wildtyp Ler-0. Eine Linie von 14 At1G19520<sub>Cvi-0</sub>-Transgenen, zeigte ein signifikant stärkeres rel. Wurzelwachstum als Ler-0. Da der Effekt nur in einer Linie auftrat, kann für dieses Gen nicht von einer Komplementation des Phänotyps ausgegangen werden, sondern von einem Positionseffekt des Transgens in dieser speziellen Linie. Transgene welche das Cvi-0 Gen At1G18960 enthalten, zeigten kein signifikant besseres Wachstum im Vergleich zu Ler-0.

Durch die Komplementationsanalyse konnten drei Gene als relevant für die Zn-Toleranz in Cvi-0 identifiziert werden. At1G18485 und At1G18810 welche im ersten Intervall liegen und At1G23040 aus Intervall 2. Transgene Linien welche eines der drei Gene enthalten zeigten eine bessere Zn-Toleranz als der WT Ler-0.

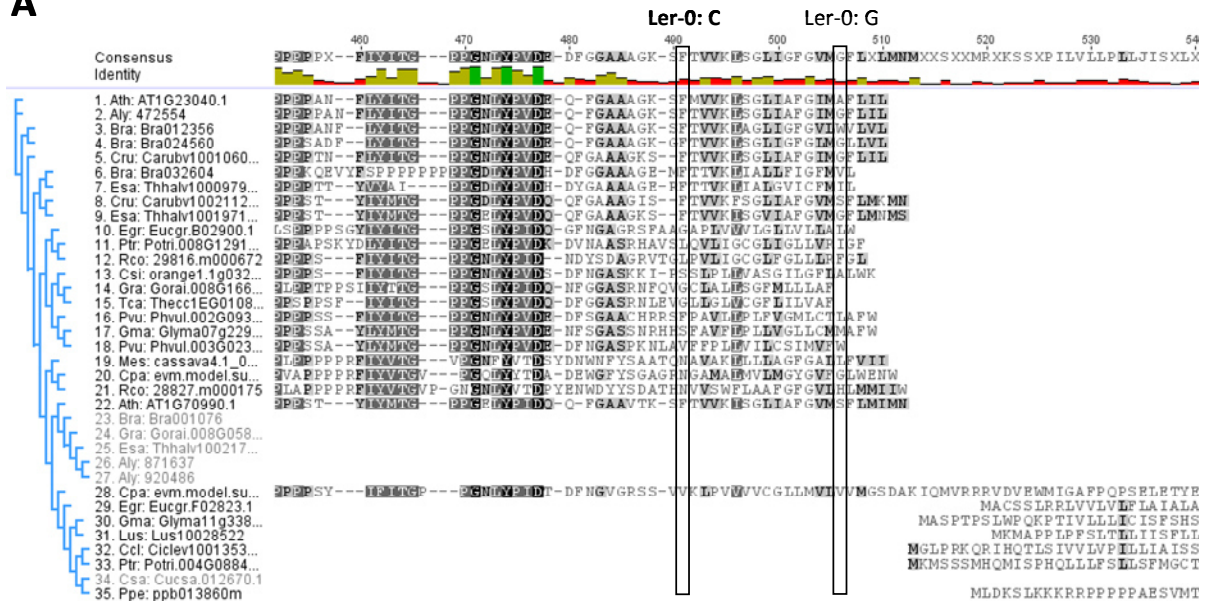
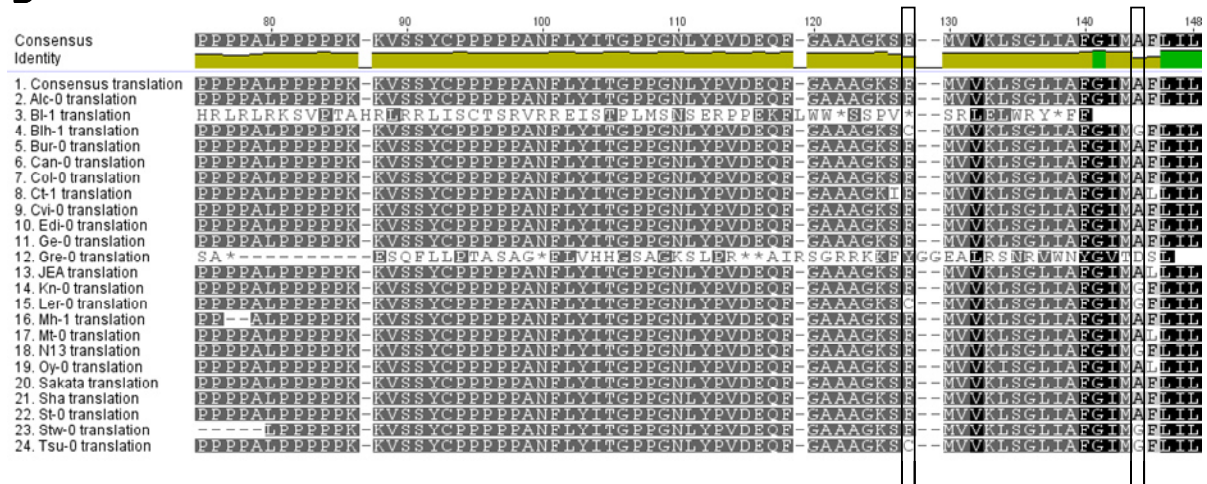


**Abb. 39:** Partielle Komplementation des Ler-0 Phänotyps durch Expression des genomischen At1G23040<sub>Cvi-0</sub>, At1G18960<sub>Cvi-0</sub>, At1G19520<sub>Cvi-0</sub>, At1G18810<sub>Cvi-0</sub> oder At1G18485<sub>Cvi-0</sub> in Ler-0. **(A)** Zn-Toleranz unabhängiger, transgener Linien, sowie von Cvi-0 und Ler-0, erfasst als relative Wurzellänge unter 60 µM ZnSO<sub>4</sub> im flüssig, 6-well System. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus 2-4 unabhängigen Experimenten n = 8-77. Signifikante Unterschiede der Transgenen zu Ler-0 wurden ermittelt mittels Einwege-Varianzanalyse und Tukey Test. **(B)** Exemplarische Abb. von Pflanzen nach Wachstum im 6-well Flüssigsystem. Die Pflanzen wurden nach Beendigung des Wachstums auf Agarplatten ausgelegt und mit der gleichen Vergrößerung fotografiert.

#### 2.2.4. At1G23040

Im Folgenden wurde At1G23040 näher analysiert. Das Gen codiert für ein 144 AS großes, glycinreiches Hydroxyprolinprotein. Eine Blast Suche ergab, dass es 89 % Ähnlichkeit zu At1G70990, einem ebenfalls nicht näher charakterisierten Protein der Familie *prolin-rich* aufweist. Proteine derselben Familie finden sich auch in anderen Spezies der *Brassicaceae* und *Rosidae* (Abb. 40).



**A****B**

**Abb. 40:** Ein Ausschnitt aus dem Proteinalignment von At1G23040 und (A) dessen *A. thaliana* Homologen: AT1G70990 sowie von Orthologen aus anderen Spezies der *Rosidae* zeigt die konservierten Bereiche [189]. Die in Ler-0 von AS-Austauschen betroffenen Positionen sind umrahmt und die in diesem Ökotyp enthaltenen AS sind über den Positionen angegeben. Speziesabkürzungen: Aly: *Arabidopsis lyrata*, Ath: *Arabidopsis thaliana*, Bra: *Brassica rapa* Chiifu-401 v1.2, Ccl: *Citrus clementina*, Cpa: *Carica papaya*, Cru: *Capsella rubella*, Csa: *Cucumis sativus*, Csi: *Citrus sinensis*, Egr: *Eucalyptus grandis*, Gma: *Glycine max*, Gra: *Gossypium raimondii*, Lus: *Linum usitatissimum*, Mes: *Manihot esculenta*, Ppe: *Prunus persica*, Ptr: *Populus trichocarpa*, Pvu: *Phaseolus vulgaris*, Rco: *Ricinus communis*, Tca: *Theobroma cacao*, Esa: *Eutrema salsugineum*, (B) zeigt einen Ausschnitt des Alignments der At1G23040 Varianten der Ökotypen der Core24 (Sequenzen: [185]). Alignments wurden errechnet mit der Basis Version des Programms *Geneious R7* Vers. 7.1.4

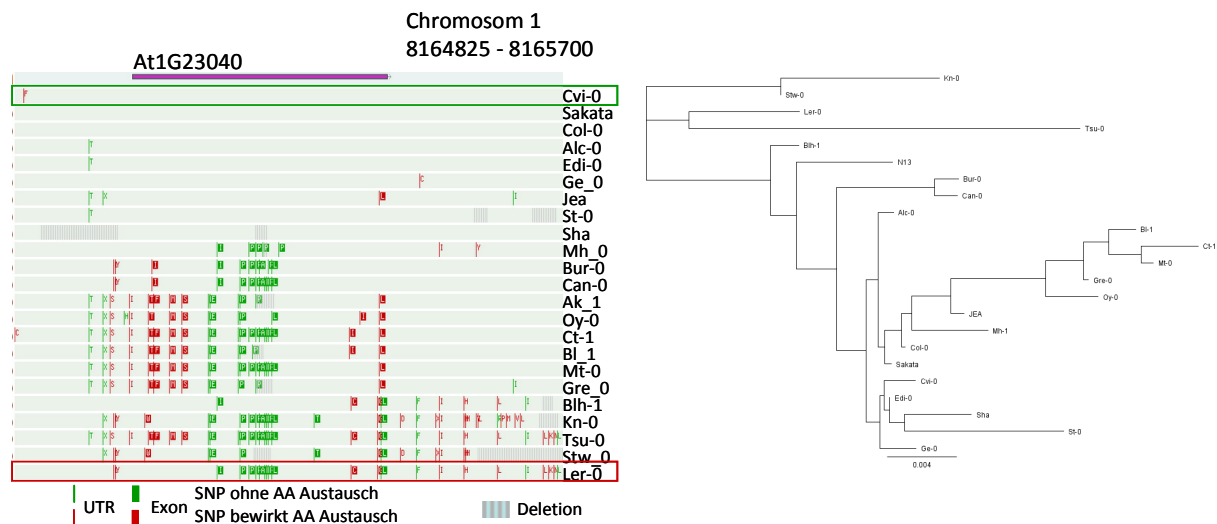
Keines dieser Gene konnten bisher funktional charakterisiert werden. Anhand des Alignments lässt sich jedoch nachvollziehen, dass es sich bei den Positionen die in Ler-0 von AS-Austauschen betroffen sind, um in *A. thaliana* Ökotypen hochkonservierte Bereiche handelt. Besonders der Austausch von Phenylalanin (F) durch Cystein (C) betrifft eine zu 100 % konservierte AS. Diese ist auch unter nahe verwandten Orthologen Genen anderer

Spezies konserviert. Eine Beeinflussung der Struktur in dieser Region ist somit wahrscheinlich. Der zweite SNP der das Ler-0 At1G23040 Gen vom Cvi-0 Gen unterscheidet, tauscht in Ler-0 ein vor allem unter verschiedenen *A. thaliana* Ökotypen konserviertes Alanin durch Glycin aus. Diese AS ist, an dieser Position im Protein, jedoch relativ häufig unter den *Rosidae* vertreten und beeinflusst die Proteinfunktion möglicherweise nicht.

Die Expression von At1g23040 wurde anhand der Datenbanken *Genevestigator* [190] und *AtGenExpress* [191] analysiert (Anhang Abb. 1-2). Danach ist At1G23040 in Wurzel und Spross exprimiert, wobei das Expressionslevel in der Wurzel grundsätzlich etwas erhöht ist. Es wurde keine entwicklungsstadiumspezifische Expression detektiert. Nur eine leicht erhöhte Expression in der Blüte und seneszenten Blättern war zu erkennen. Daneben wurde die Expression von At1G23040 als Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse dokumentiert. Sie wird demnach beeinflusst durch ABA (Induktion), JA, Zeatin, Cycloheximid und GA (Repression). Es war kein Einfluss von Licht erkennbar. Einige abiotische Faktoren: Mannitol und NaCl, induzierten die Expression und wenige biotische Faktoren könnten die Expression von At1G23040 ebenfalls regulieren. Durch die Analyse der Information über die Expression von At1G23040, welche in den Datenbanken *Genevestigator* [190] und *AtGenExpress* [191] enthalten sind, konnte zusammenfassend die Aussage getroffen werden, dass es sich bei At1G23040 nicht um ein generell Stress-responsives Gen handelt. Daraufhin wurde die Expression in den beiden Ökotypen, in Abhängigkeit von Zn untersucht. Vorläufige Ergebnisse lassen darauf schließen, dass nach Zn-Behandlung keine Unterschiede in der At1G23040 Expression zwischen den Ökotypen vorliegen (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse mit weiteren Methoden als der hier verwendeten q RT-PCR ist jedoch vorzuziehen, bevor eine abschließende Aussage über die Zn-Responsivität getroffen wird. Da es viele Sequenzunterschiede zwischen den allelischen Varianten von At1G23040 gibt ist ein Unterschied in der Effektivität der PCR Reaktion für Cvi-0 oder Ler-0 nicht auszuschließen und muss noch genauer untersucht werden.

Die Aminosäuresequenz von At1G23040 ist in Ler-0 durch SNPs verändert gegenüber der in Cvi-0 (Abb. 38, 40, 41). Daneben gibt es weitere Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwischen Ler-0 und Cvi-0 in der umgebenden Region. Dazu gehören größere Deletionen von mehr als 20 bp in der genomischen Region von Ler-0 welche auf das Gen At1G23040 folgt.

Vergleicht man At1G23040 mit angehängter genomischer Sequenz in der *Core24*, einer Kollektion von 24 Ökotypen die die Diversität von *A. thaliana* repräsentieren sollen [192], erkennt man, dass es sich bei Cvi-0 und Ler-0 um zwei in dieser Region sehr diverse Ökotypen handelt (Abb. 41). Es werden unterschiedliche Haplotypen deutlich, die sich in der Nukleotidsequenz an dem At1G23040 Locus unterscheiden. Cvi-0, Sakata, Col-0, Alc-0 und Edi-0 gehören einem Haplotyp an, der als Cvi-0 ähnlich bezeichnet werden kann.



**Abb. 41:** Sequenzvergleich der *Core24* Ökotypen **(A)** Das Alignment von 900 bp [185] zeigt die AS-Austausche und Deletionen in At1G23040 sowie dessen UTR in Referenz zu Col-0. Der Zn-tolerante Ökotyp Cvi-0 ist grün umrahmt, der Zn-sensitive Ökotyp Ler-0 rot. **(B)** Dendrogramm von At1G23040 Varianten. Abgeleitet aus einem Nukleotidalignment einer 1.5 kb großen, genomischen Region von 8164525 - 8166024 bp von 21 Sequenzen aus Ökotypen der *Core24* [192]. Die Sequenzen beinhalten das Gen At1G23040 (welches bei 8165025 – 8165459 bp liegt), sowie dessen regulatorischen Region. Berechnung des Alignments und Verwandtschaftsbaumes erfolgte mit *Geneious R7* Version 7.1.4, *Neighbor Joining Methode* (Alignment erstellt nach Sequenzen von: 1001 genomes [185]).

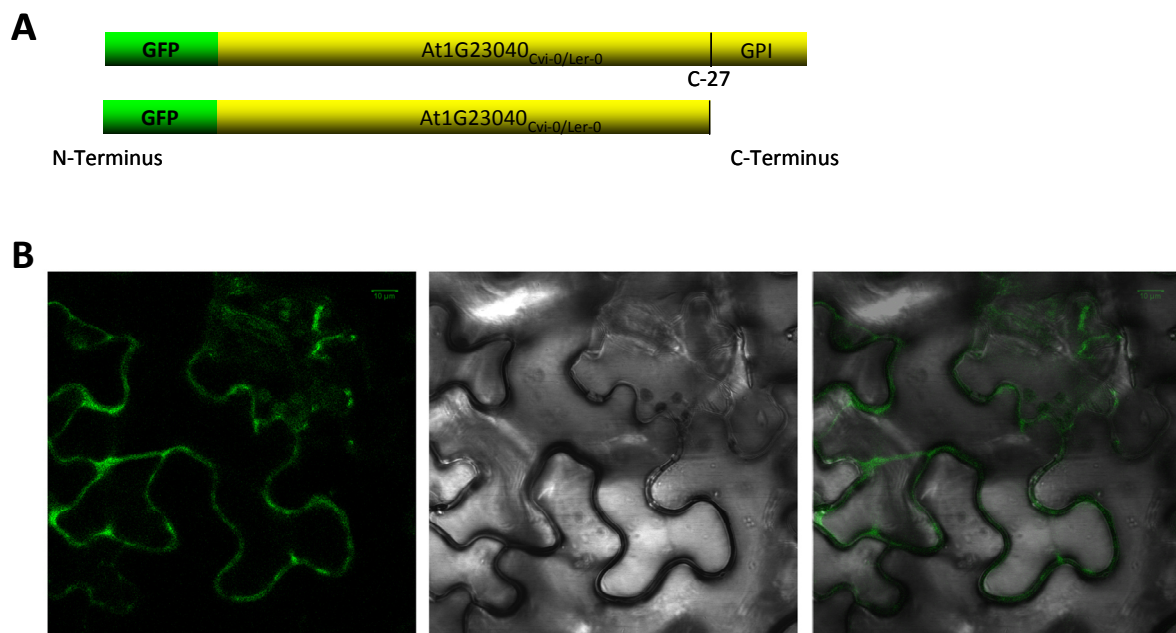
Durch eine Clusteranalyse wurde die genomische Region um At1G23040 zwischen den Ökotypen verglichen. Auch in dieser Darstellung wurde ersichtlich, dass sich Ler-0 und Cvi-0 sehr stark unterscheiden (Abb. 41 B). Drei weitere Ökotypen wurden für eine Analyse von At1G23040 ausgewählt: Col-0, Bur-0 und Kn-0. Dabei ähnelt Col-0 in dieser Region dem toleranten Ökotyp Cvi-0. Der Ökotyp Bur-0 enthält einige der Ler-0 entsprechenden SNPs. Die Region weist aber insgesamt eher eine Cvi-0 ähnlich Sequenz auf, insbesondere in der codierenden Region von At1G23040. In dieser sind keine SNPs enthalten welche die AS Sequenz im Vergleich zu Cvi-0 verändern. At1G23040<sub>Kn-0</sub> ist dagegen dem des sensitiven Ökotyps Ler-0 ähnlich. Aus jedem dieser Ökotypen, welche jeweils einen Haplotyp repräsentieren, wurde ein genomisches Fragment von 3 kb amplifiziert. Dieses enthält das Gen At1G23040 und die 3' und 5' regulatorischen Elemente. Die Fragmente entsprachen

dem bereits klonierten Fragment aus Cvi-0, welches für die Komplementation der Zn-Sensitivität von Ler-0 verwendet wurde. Die Fragmente wurden ebenfalls in den Vektor pMDC123 kloniert. Neben den Ler-0-At1G23040<sub>Cvi-0</sub> transgenen Linien wurden so Ler-0-At1G23040<sub>Col-0</sub>, Ler-0-At1G23040<sub>Bur-0</sub>, Ler-0-At1G23040<sub>Kn-0</sub> und Ler-0-At1G23040<sub>Ler-0</sub> transgene Linien erzeugt. Eine Komplementation des Ler-Phänotyps durch die Col-0 und Bur-0 Varianten von At1G23040 aber nicht durch die Varianten aus den Ökotypen Ler-0 und Kn-0 könnte als weiterer Beleg dafür dienen, dass es sich bei At1G23040 um eines der Gene handelt, die für die größere Zn-Toleranz von Cvi-0 verantwortlich sind.

Neben der Analyse weiterer transgener Ler-0 Linien sollte die Charakterisierung von At1G23040 *knock-out* Linien Hinweise über die Funktion des Gens liefern. Für diesen Zweck wurden die beiden verfügbaren T-DNA Insertionslinien in At1G23040 analysiert. Die Linien SALK\_073423 und SALK\_118693 sollten homozygote Insertion tragen. In SALK\_118693 liegt sie laut *Tair* Datenbank in Exon 1, 28 bp nach den Start Codon, in SALK\_073423 in der regulatorischen Region 302 bp vor dem ATG. Eine erneute Genotypisierung der Linien mit Primern, welche sowohl die Region des Gens vor und nach der beschriebenen Insertion umspannten, als auch zusätzlich einen Bereich der 3' regulatorischen Sequenz (Primer SF042, SF043, SF044 in Kombination mit LBa1 und LBb1, Vgl. Anhang Tab. 1) zeigte jedoch, dass die T-DNA Insertion in der Linie SALK\_118693 nicht an der beschriebenen Position lag. Diese Linie ist somit kein At1G23040 *knock-out*. In der Linie SALK\_073423 konnte die homozygote Insertion in der regulatorischen Region bestätigt werden (Primerkombination SF041 und LBa1 und LBb1, Vgl. Anhang Tab. 1). Im Folgenden wurde untersucht ob die Insertion einen Effekt auf die Expression des Gens in Col-0 hat. Dafür wurde die Expression mittels RT PCR von Col-0 und 4 SALK\_073423 Linien verglichen. Es konnten dabei keine Expressionsunterschiede festgestellt werden. Zudem wurde die Toleranz der SALK Linien mit der von Ler-0, Cvi-0 und Col-0 verglichen (Anhang Abb. 4). Wie erwartet ergaben sich keine Wachstumsunterschiede zwischen Col-0 und den T-DNA Insertionslinien.

Bisher kann der Effekt eines At1G23040 *knock-outs* nicht abgeschätzt werden, da keine T-DNA Insertionslinien in dem Gen charakterisierbar waren. Dieses Problem könnte durch die Generation von RNAi Linien, in welchen das Transkriptlevel von At1G23040 stark reduziert ist, gelöst werden.

Für das Protein At1G23040 ist eine Lokalisation an der Zellwand beschrieben (GO 0031225: „*anchored to membrane*“ [189]). Diese Funktion ist abgeleitet aus der bioinformatischen Analyse der Proteinsequenz, welche das Vorhandensein einer Erkennungssequenz zum Anhang eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Ankers bis 27 [193] bzw. 25 [194] AS vom C-Terminus entfernt vorhersagt. Da in Ler-0 Austausch in At1G23040 6 bzw. 21 AS vom C-Terminus entfernt liegen, kann dadurch die posttranslationale Modifikation des Proteins [195] durchaus beeinträchtigt werden. Um die subzelluläre Lokalisation in Cvi-0 und Ler-0 zu vergleichen, wurde die codierende Region des Gens aus Cvi-0 und Ler-0 amplifiziert und in den Vektor pMDC34 kloniert. In diesem wurde das Gen N-terminal mit GFP fusioniert und die Expression über einen 35s Promotor gesteuert. Zudem wurde eine, um die GPI Anker-Erkennungssequenz verkürzte Version des Gens aus beiden Ökotypen amplifiziert und in den Vektor kloniert. So sollte analysiert werden ob die Lokalisation durch den Verlust des GPI Ankers verändert wird.



**Abb. 42:** Lokalisation der beiden At1G23040 Varianten. **(A)** Schematische Darstellung der erstellten Konstrukte. Die codierende Region von At1G23040 aus Cvi-0 und Ler-0 wurde mit einem GFP Tag fusioniert. Für zwei weitere Varianten wurden 27 Aminosäuren vom C-Terminus, und somit der GPI Anker [193], entfernt. **(B)** Expression der getaggten At1G23040 Varianten in *N. tabacum* zeigte eine Misslokalisierung zum Zytosol wie am GFP Signal durch konfokale Mikroskopie von Blättern infiltrierter Tabakpflanzen zu erkennen. Exemplarische Darstellung des GFP-cAt1G23040<sub>Cvi-0</sub> Signals in *N. tabacum*.

Die 4 Proteinvarianten (Abb. 42 A) von GFP-At1G23040 wurden transient in Tabak exprimiert. Die Lokalisation des fluoreszierenden Proteins wurde mikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich, entgegen den Erwartungen eine Lokalisation der Proteine im Zytosol (Abb.

42 B). Aufgrund der bioinformatischen Vorhersagen über die Proteindomänen, könnte es sich dabei um eine Fehllokalisierung des GFP-Fusionsproteins handeln.

Es waren keine Unterschiede in der Lokalisation des Fluoreszenzsignals der 4 Varianten des Proteins erkennbar (Daten nicht gezeigt). Alle 4 Varianten sind im Zytosol lokalisiert, weshalb der Effekt des GPI Ankers auf die subzelluläre Lokalisation von At1G23040 nicht beurteilt werden kann. Auch ein Unterschied in der Lokalisation der Cvi-0 und Ler-0 Varianten des Proteins ist so nicht feststellbar.

### **3. Diskussion**

Die Grundlage der Cvi-0 Zn-Toleranz wurde untersucht. Die Aufklärung der Toleranz gegenüber exzessiven Mengen des Schwermetalls sollte neue Gene in der Zn-Homöostase implizieren.

Cvi-0 ist im generell verwendeten Wachstumstest nicht Zn-toleranter als Ler-0. Das Wachstum beider Ökotypen wurde durch eine ZnSO<sub>4</sub> Behandlung gleichermaßen reduziert. Erst durch einen Wachstumstest im flüssigen Medium, bei dem kein Agar zur Verfestigung der 1/10 Hoagland Nährlösung verwendet wurde, konnte die höhere Toleranz von Cvi-0 sichtbar gemacht werden. In diesem System zeigte sich ein starker Unterschied in der Toleranz bei 60 µM ZnSO<sub>4</sub>. Bei dieser Konzentration erreichte Cvi-0 60 % des Wachstums unter Kontrollbedingungen. Ler-0 Wurzeln konnten nur 20 % der Länge unter Kontrollbedingungen erreichen. Dies zeigt den Einfluss des Geliermittels auf das Wachstum der Pflanzen. Agar enthält Verunreinigungen mit Makro- und Mikroelementen die neben dem generellen Wachstum auch den Phänotyp unter Zn-Stress beeinflussen können [140]. Vor allem Ca hat einen positiven Einfluss auf die Zn-Toleranz von Pflanzen [196, 197]. Die relativ hohen Ca-Konzentrationen im verwendeten Agar Typ A könnten demnach für die Maskierung der Zn-Toleranz von Cvi-0 verantwortlich sein.

Mit der Etablierung des Wachstumstest mit flüssigem Medium konnte der Phänotyp der Cvi-0 X Ler-0 RILs ermittelt werden. Diese Mapping Population wurde schon 1998 etabliert [122] und wird seitdem für die Untersuchung einer Vielzahl von Phänotypen verwendet. Zum Beispiel konnte 2008, durch die Analyse der Cu-Toleranz der Cvi-0 X Ler-0, das Gen *HMA5* detektiert werden, welches zur Cu-Toleranz beiträgt [124].

Eine Korrelation der Zn-Toleranz mit dem jeweiligen Genotyp jeder RIL ermöglichte die Detektion von zwei QTL Regionen auf Chromosom1. Durch weitere Markeranalysen der RILs konnten die Regionen eingegrenzt werden. Region 1 lag bei 6.3 bis 6.9 Mb und enthielt 196 Gene, Region 2 lag bei 8.1646 bis 8.169 Mb und enthielt 2 Gene, At1G23040 und At1G23050. Durch eine Kreuzung der RIL X124 mit Ler-0, wurde ein Versuch unternommen, in einer Zn-toleranten Linie einen kleineren Bereich an Cvi-0 Allelen in Region 1 zu erzeugen. In der F2 dieser Kreuzung wurden 90 Individuen genotypisiert. Es konnten dadurch einige

Rekombinationsereignisse detektiert werden. Dadurch, dass sich die Betrachtungen auf nur eine der QTL Regionen beschränkten, war es jedoch nicht mehr möglich Wachstumsunterschiede zwischen den Nachkommen verschiedener F2 Individuen verlässlich zu erfassen. Der Einfluss dieses einen Lokus auf den Phänotyp war möglicherweise zu gering um noch Unterschiede im Zn-Toleranzphänotyp zu erzeugen. Eine andere Erklärung für eine fehlende Korrelation zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp der F2-abgeleiteten Linien bestünde darin, dass die Eltern RIL fehlerhaft genotypisiert worden sein könnte. Dadurch wäre eine falsche Eingrenzung des Intervalls erfolgt und die Genotypisierungen der F2 hätten sich auf den falschen Bereich konzentriert. Möglich erschien dies, da die RIL X124 nur in einem sehr kleinen Bereich Ler-0 Allele oberhalb der Kandidatenregion aufwies. Eine Sequenzierung sollte den Genotyp der RIL in diesem Bereich deshalb bestätigen. Es zeigte sich ein Vorhandensein von Ler-0 Allelen, wie auch schon durch die CAPS Markeranalyse angedeutet. Es waren jedoch auch Cvi-0 SNPs detektierbar, sowie Deletionen welche nicht in der Cvi-0 oder Ler-0 Referenzsequenz vorkommen. Es scheint eine komplexere genetische Situation vorzuliegen, als durch die CAPS Markeranalyse zu vermuten war. Die Verwendung von CAPS Markern erlaubt die Bestimmung des Genotyps nur an genau einem Basenpaar im Genom. Dadurch können nicht alle genetischen Unterschiede die zwischen den Linien bestehen durch eine CAPS Marker Analyse der Genome identifiziert werden. Trotz allem konnte durch die Bestätigung der Ler-0 SNPs in der Region um 5.6 Mb auf Chromosom 1 der Linie X124 gezeigt werden, dass eine Eingrenzung der QTL Region in diese Richtung durch die Linie X124 möglich war.

Statt einer weiteren genetischen Eingrenzung der Region, wurden Daten über Zn-Responsivitäten von Genen im QTL Bereich und Informationen über AS Unterschiede von Cvi-0 und Ler-0 Proteinen gesammelt. Funktionsunterschiede zwischen den Ökotypen können auf mindestens zweierlei Art entstehen. Einmal kann eine erhöhte oder verringerte Transkriptionsrate unter Zn-Stress die Funktion eines Gens beeinflussen, zum anderen kann die Funktion des Proteins durch Änderungen in der AS Sequenz beeinflusst werden. Dieser Zusammenhang konnte beispielsweise durch die Analyse der natürlichen Variation in dem Mo-Gehalt von Col-0 und Ler-0 gezeigt werden. Der Unterschied beruht auf dem Gen *Mot1*, welches durch eine BSA Analyse identifiziert werden konnte. In Ler-0 konnte im *Mot1* Lokus eine Deletion in der Promotorregion identifiziert werden. Diese führt zu einer verringerten



Expression von *Mot1* in Ler-0, im Vergleich zu Col-0. Im weiten Verlauf wurden Ler-0 ähnliche Deletionen in 7 von 92 untersuchten *A. thaliana* Ökotypen detektiert. Für diese 7 Ökotypen konnten ebenfalls stark verringerte Mo-Gehalte im Spross detektiert werden. Die natürliche Variation welche in der Expression des mitochondrialen Mo-Transporters *Mot1* detektiert werden kann, konnte demnach als Ursache für die Mo-Gehalte in der Pflanze identifiziert werden [198]. Damit konnte auch ein wichtiger Faktor in der Mo-Homöostase identifiziert werden. Es gibt viele weitere Beispiele welche demonstrieren wie die Veränderung der Expression die Proteinfunktion beeinflussen kann. An dieser Stelle sei nur noch eines genannt, welches ebenfalls durch die Analyse natürlicher Variation identifiziert werden konnte. Baxter *et al.* demonstrierten, dass eine höhere Expression von *Hkt1* in den Wurzeln zu einer Verringerten Na-Akkumulation im Spross führt, und das Ökotypen mit einer geringeren Expression Salztoleranter sind und tendenziell näher an Salzquellen wie zum Beispiel Küstenregionen auftreten, was möglicherweise eine lokale Adaptation an den Salzgehalt des Bodens darstellt [129].

Zu den dramatischsten Veränderungen der Nukleotidsequenz eines Gens zählen Insertionen welche einen „*frame shift*“ im Leseraster zur Folge haben, sowie Deletionen mit derselben Konsequenz und Mutationen die in einem frühen STOP Codon resultieren. Dies kann durch SNPs, Insertionen und Deletionen entstehen. Die Expression eines Gens welches von solchen Änderungen in der Sequenz betroffen ist, führt in der Regel nicht mehr zu einem funktionalen Protein. So zeigte zum Beispiel die Analyse der Variation, welche in der Bildung von Schleimstoffen bei der Samenkeimung zwischen den Ökotypen Shahadra und Col-0 beobachtet werden konnte, dass in Shahadra eine Deletion in einem  $\beta$ -D-Galactosidase Gen aufweist. Ein Verlust der Proteinaktivität dieser  $\beta$ -D-Galactosidase führt zu einer Verringerung der Bildung von Schleimstoffen durch Samen bei der Keimung [199].

Neben dem kompletten Verlust eines Proteins durch eben genannte Veränderungen in der Gensequenz, kann es auch zu subtileren Änderungen der Proteinfunktion durch AS-Austausche kommen. Dabei kann die Funktion eines Proteins gestört werden, wenn konservierte AS von solchen Austauschen betroffen sind. Hier sollen nur zwei Beispiele angesprochen werden. Sowohl für HMA3 als auch für HMA5 konnten verschiedene Haplotypen, das heißt verschiedene AS-Varianten der Proteine, unter 149 bzw. 103 *A. thaliana* Ökotypen identifiziert werden [93, 124]. Dadurch konnte ein Funktionalitätsverlust des jeweiligen Transporters durch jeweils 2 AS-Austausche (bzw. den

Verlust einer ATPase Domäne im Falle von HMA3) erklärt werden. Die Analyse der natürlichen genetischen und phänotypischen Variation trägt demnach nicht nur zur Identifikation von Genen, beteiligt in der Metallhomöostase bei, sie ermögliche auch eine funktionelle Charakterisierung der Proteine welche von den identifizierten Genen codiert werden.

Für die in dieser Mapping Analyse identifizierten Kandidatengene, wurde die Konservierung der einzelnen AS bestimmt. Grundlage dafür war ein multiples Sequenzalignment und eine Gewichtung der vorkommenden AS, auch als SIFT Analyse bezeichnet. Daraufhin konnten AS-Austausche in Ler-0 oder Cvi-0 als tolerierbar (Proteinfunktionalität bleibt erhalten) und nicht tolerierbar (bleibt vermutlich nicht erhalten) klassifiziert werden [142, 143]. So konnte eine Liste an Kandidatengenen erstellt werden, welche in der QTL Region von 6.3 bis 6.9 Mb liegen und für eine in Cvi-0 oder Ler-0 veränderte, nicht tolerierbare AS Sequenz codieren. Zusätzlich wurden Gene der eingegrenzten QTL Region identifiziert, die in früheren Microarrayanalysen Zn-responsiv waren. Die Liste der so priorisierten Kandidaten enthielt nun noch 33 Gene. Für diese Gene wurden T-DNA Insertionslinien erworben. Zeigt sich eine dieser T-DNA Insertionslinien in zukünftigen Zn-Toleranzversuchen hypersensitiv, ist dies ein Hinweis auf die Funktion des Gens in der Zn-Toleranz. Zudem wurden 4 Gene für Komplementationsanalyse ausgewählt. Die Cvi-0 Varianten der Gene wurden in Ler-0 transferiert. Dabei wurde nicht nur die codierende Sequenz, sondern auch alle regulatorischen Elemente der Gene mit transferiert, um die Regulation der Expression wie in Cvi-0 zu erhalten. Dadurch können Zn-relevante Funktionen, welche sich aus der Regulation ergeben, in Ler-0 erhalten werden. Vier Gene wurden aufgrund der Identifikation von Unterschieden in essenziellen AS, unter Kandidatengenen eines zwischenzeitlich stärker eingegrenzten QTL Intervalls, für die Komplementation ausgewählt: At1G18485 (*Pentatricopeptide repeat* (PPR) Superfamilie), At1G18810 (verwandt mit Phytochrom Kinase Substraten), At1G18960 (Proteinfamilie: myb-ähnlicher HTH transkriptioneller Regulator) und At1G19520 (NFD5: *Nuclear Fusion Defective 5*). At1G18960 wurde dabei als Kontrolle verwendet. Für dieses Gen wurden durch den SIFT Algorithmus nicht tolerierbare AS in den Proteinen beider Ökotypen vorhergesagt. Sie sollten demnach sowohl in Cvi-0 als auch in Ler-0 keine Funktion in der Zn-Homöostase erfüllen können.

Für Region 2 wurde die Eingrenzung des Cvi-0-Allel-enhaltenden Intervalls durch eine Sequenzierung bestätigt. Von den zwei Genen wies At1G23040 zwei AS-Austausche in Ler-0 auf, At1G23050 unterschied sich in nur einer AS zwischen Cvi-0 und Ler-0. Die Zn-tolerante RIL X118 enthält ein At1G23040 Gen mit Cvi-0 Sequenz, und ein At1G23050 Gen mit Ler-0 Sequenz. In dieser Zn-toleranten RIL blieb damit im QTL Intervall 2 nur ein Gen, dessen Produkt eine Cvi-0 Sequenz aufwies. Mit der Cvi-0 Version von At1G23040 wurde Ler-0 komplementiert.

Der Phänotyp aller Komplementationslinien wurde im 6-well Flüssigsystem unter Zn-Stress erfasst. Tatsächlich zeigte sich eine partielle Komplementation des Zn-sensitiven Phänotyps von Ler-0 durch die Gene At1G18485<sub>Cvi-0</sub> und At1G18810<sub>Cvi-0</sub> in der ersten und At1G23040<sub>Cvi-0</sub> in der zweiten QTL Region. Sie wurden bisher noch nicht im Zusammenhang mit Metalltoleranz oder -homöostase beschrieben. Bestätigt sich also die Komplementation in weiteren Versuchen, wurden diese drei Gene in der vorliegenden Arbeit erstmals als Zn-toleranzrelevante identifiziert. Um den Phänotyp zu bestätigen wird aktuell ein weiteres Flüssigsystem für Keimlinge etabliert. Bei diesem werden die Pflanzen nicht im flüssigen Medium inkubiert sondern durch schwimmfähige Nylonnetze an der Oberfläche des Mediums gehalten werden. Dieses System ermöglicht den Gasaustausch mit der Umgebung über die Spaltöffnungen der Blätter, wie es unter natürlichen Bedingungen der Fall ist. Damit stellt es eine naturähnlichere Situation her, als es im 6-well System möglich ist. Bisherige Tests zeigten, dass eine Replikation des Cvi-0 Zn-Toleranzphänotyps in diesem System möglich ist, wodurch es sich zur Erfassung der Komplementation von Ler-0 durch die 3 Kandidatengene eignet.

Bestätigten sich At1G18485 und At1G18810 als Zn-toleranzrelevant, schließt sich die Suche nach dem Mechanismus über den diese Zn-Toleranz vermittelt wird an. Für At1G18485 wurde eine Lokalisation im ER oder Chloroplast vorhergesagt [200]. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Zn gestressten Cvi-0 und Ler-0 Zellen könnte Unterschiede zwischen den Ökotypen sichtbar machen. Zudem könnte die DYW Domäne welche am C-terminus von At1G18485 sitzt eine katalytische Funktion besitzen. Grund für diese Annahme ist eine konservierte CxxCH Sequenz welche der Hämbindestelle der Cytochrom C Proteinfamilie entspricht (PROSITE: PDOC00169). Diese Sequenz, in

Kombination mit zwei weiteren konservierten Cysteinen und einem Histidin, könnte einer katalytischen Domäne entsprechen [201]. Das Substrat für At1G18485 könnte durch Ko-Immunopräzipitation (Co-IP) von Proteinen identifiziert werden. Dabei könnte Zn auch einen Einfluss auf die Substratbindung haben. Die Funktion von At1g18810, oder PSK3, wurde bisher im Zusammenhang mit der Phytochrom-vermittelten Reaktion auf unterschiedliche Lichtverhältnisse beschrieben. Phytochrome reagieren auf rotes und dunkelrotes Licht und vermitteln Entwicklungsprozesse im Keimling sowie Anpassungsreaktionen wie die Schattenvermeidung [202]. PSK1, ein weiteres der 4 PSKs in *Arabidopsis*, wird dabei von Phytochromen phosphoryliert [203]. Eine Rolle von PSK3 bei der Zn-Toleranz könnte durch Analyse von *psk3*-Mutanten weiter aufgeklärt werden. Zunächst sollte für diese Mutanten die Zn-Toleranz untersucht werden. Ob ein Zusammenhang mit der Lichtperzeption besteht, und inwiefern Zn hier in die Signalweiterleitung involviert ist, könnte ebenfalls an den *psk3*-Mutanten untersucht werden.

Das Hydroxyprolin-reiche Protein für welches At1G23040 codiert, ist bisher nur in Zusammenhang von genomweiten Analysen erwähnt. Es existieren keine Studien über At1G23040. Das 144 AS große Protein hat ein Molekulargewicht von 15 kDa, einen isoelektrischen Punkt von 7.8 und 2 vorhergesagten Transmembrandomänen. Ein Alignment von Orthologen in der Unterklasse der *Rosidae* zeigte eine Konservierung vor allem in den Prolin reichen Regionen. Die AS die in Ler-0 vom Austausch betroffenen sind, sind in 19 bzw. 16 von 24 *A. thaliana* Ökotypen konserviert. Eine der AS ist auch unter einigen Arten der *Rosidae* konserviert. Das At1G23040 Orthologe im nächsten Verwandten von *A. thaliana*, *A. lyrata* trägt den Namen kg.1 und ist annotiert als Nährstoffspeicherprotein. Die Hydroxyprolin-reichen Proteine (HRGPs), zu welchen At1G23040 gehört, können in drei Klassen diverser Funktionen aufgeteilt werden. At1G23040 wird den Extensinen (EXT) und hier der Gruppe der *short Extensins*, welche 12 Proteine umfasst, zugeordnet. Es wird auch als EXT31 bezeichnet. Der allgemeine Aufbau von Proteinen in dieser Klasse umfasst ein N-Terminus mit Signalpeptid, ein SP5 Motiv (Ser-Pro5x), ein SP4 Motiv, drei YXY Motive (Tyr-X-Tyr) und einen C-Terminus mit GPI-Anker-Anhangssequenz [204]. Eine mögliche Funktion von Extensinen ist die Regulation des Streckungswachstums. Durch eine Auflösung des Netzwerkes aus miteinander verlinkten Zellwandpektinen und Extensinen könnte ein Auseinandergleiten der Zellulosefibrillen ermöglicht werden. Diese Hypothese wird durch

die Beobachtung, dass Extensine ihre höchste Konzentration nach Abschluss des Zellwandwachstums erreichen jedoch geschwächt. Hier wird die Bildung des Extensin-Zellulosenetzwerkes mit der Festigkeit der Zellwand in Verbindung gebracht [205]. Auch in der Verteidigung der Pflanze gegen Pathogene scheinen Extensine eine Rolle zu spielen, möglicherweise durch die Etablierung einer physikalischen Barriere [205]. Um die Funktion von At1G23040 oder EXT31 zu erfassen, sollte die Zellwand von Cvi-0 und Ler-0 analysiert werden. Eine Detoxifikation durch diese wurde für mehrere Schwermetalle beschrieben, zum Beispiel für Pb, welches in der Zellwand abgelagert werden kann [167, 206–208]. Für Zn konnte gezeigt werden, dass 30 % des gesamten Gehaltes in der Wurzel an die Zellwand gebunden ist [25]. Durch verschiedene funktionale Gruppen ist die Zellwand in der Lage, positiv geladene Ione zu binden. Wichtig dafür sind –COOH, –OH und –SH Gruppen. Die Kapazität wird dabei hauptsächlich durch die Menge an Polysacchariden mit Carboxylgruppen bestimmt [209]. Für eine Beeinflussung der Toleranz durch Bindung von Schwermetallen an die Zellwand gibt es bisher allerdings wenig experimentelle Nachweise. Die besonders tolerante *Silene vulgaris* ssp. *humilis* lagert diverse Schwermetalle in der Zellwand ein, was für deren Detoxifizierung relevant sein könnte [210]. Um dieser Funktion von At1G23040 nachzugehen könnte eine Analyse der Zellwandstruktur mit elektronenmikroskopischen Methoden und durch Immunodetektion von gering-methylesterifiziertem Homogalacturonan erfolgen. Homogalacturonan ist eines der 4 Pektine aus welchen die Zellwand aufgebaut ist und enthält freie Carboxylgruppen, besonders im gering-methylesterifizierten Zustand. In diesem ist es in der Lage besonders viele positiv geladene Metallionen zu binden [209]. Neben Unterschieden in der Struktur könnte auch eine Analyse der Zn-Konzentration in der Zellwandfraktion von Cvi-0 und Ler-0 zeigen, ob die Bindekapazität einen Teil der Toleranz von Cvi-0 ausmacht.

Die Expression von At1G23040 [186, 190] war in Keimlingen leicht erhöht, was grundsätzlich die in Keimlingen beobachtete Zn-Toleranz beeinflussen könnte. Daneben zeigten zugängliche Informationen über das Expressionsverhalten von At1G23040, eine leichte Responsivität auf nur einige der untersuchten Stressoren. Bei dem Extensin scheint es sich demnach nicht um ein Gen der generellen, unspezifischen Stressantwort zu handeln. Zwischen den Ökotypen konnten keine Unterschiede in der Expression nach Zn-Behandlung detektiert werden. Aufgrund der Sequenzvariation zwischen Cvi-0 und Ler-0 sind diese Ergebnisse jedoch noch zu validieren.

Unter den Ökotypen der *Core24* [192], wurden die Nukleotidsequenzen von At1G23040, sowie die regulatorischen Regionen um das Gen verglichen. Die Ökotypen wurden, aufgrund ihrer SNPs im Vergleich zu Col-0, in 6 Haplotypen eingeteilt. Der Ler-0 Haplotyp wies dabei die größten Sequenzunterschiede zum Cvi-0 Haplotyp auf. Es wurden auf Basis dieser Vergleiche drei weitere Ökotypen ausgewählt, deren Sequenzen von und um At1G23040 sich entweder nicht, wenig oder sehr stark vom Cvi-0 Haplotyp unterschieden. Ler-0 wurde daraufhin mit At1G23040<sub>Col-0</sub>, At1G23040<sub>Bur-0</sub> und At1G23040<sub>Kn-0</sub>, transformiert. Eine Komplementation des Zn-sensitiven Ler-0 Phänotyps war nur im Falle der At1G23040<sub>Col-0</sub> Transgenen erwartet. Ler-0 welches At1G23040<sub>Kn-0</sub> exprimiert sollte keine Komplementation zeigen. Als zusätzliche Kontrolle wurden zudem At1G23040<sub>Ler-0</sub> transgene Ler-0 Linien hergestellt. Es wird vermutet, dass eine Verdopplung des Transkriptes eines potenziell nicht funktionalen Genproduktes in diesen Linien ebenfalls nicht zur Komplementation des Phänotyps führt. Für die At1G23040<sub>Bur-0</sub> Transgenen bleibt abzuwarten, ob eine Komplementation des Phänotyps möglich ist. Dies würde einen Hinweis darauf geben, ob die Sequenzunterschiede in Bur-0 die Funktion des Proteins beeinflussen.

Neben der Komplementation sollte die Funktion von At1G23040 durch Charakterisierung zweier *knock-out* Linien in Col-0 erfolgen. Es zeigte sich jedoch, dass keine der annotierten T-DNA Insertionslinien das Gen At1G23040 betraf. Damit übereinstimmend konnte auch kein Wachstumseffekt im Vergleich zu Col-0 festgestellt werden. Unter den 21 *short Extensins* zu welchen At1G23040 oder EXT31 gehört [204], ist nur eines bisher (außer in genomweiten Studien) näher beschrieben [211]. Für keines gibt es bisher Informationen über Phänotypen von T-DNA Insertionslinien oder Mutanten [187]. Um trotzdem etwas über mögliche Funktionen der Extensine zu erfahren, wurden auch Untersuchungen von *classical Aarabinogalactan-proteins* (AGPs) nach mutanten Phänotypen durchsucht. Die *classical* AGPs unterscheiden sich dabei in ihrer generellen Struktur unter den HPRG am wenigsten von den *short Extensins* [204]. Sie enthalten ebenfalls ein N-terminales Signalpeptid und eine C-terminale GPI Anker-Anhangssequenz. Zum Beispiel führte ein AtAGP19 *knock-out* laut Yang *et al.* zu weit gefassten phänotypischen Veränderungen [212]. Betroffen waren Hypokotyllänge, Größe der Pflanzen, Fertilität, Chlorophyll und Anthocyangehalt und die Pigmentierung. Eine andere AGP Mutante *sos5* reagiert sensitiv auf Salzstress, wobei eine Veränderung der Zellwandstruktur impliziert wurde [213]. Es ist denkbar, dass AGPs welche zunächst über den GPI Anker in der Plasmamembran fixiert sind, durch Abspaltung *via*.

Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipasen frei werden und dadurch eine Funktion in der zellulären Signalweiterleitung haben [214, 215]. Ein Einfluss in der Signalgebung könnte auch die diversen Phänotypen erklären welche für einzelne Mutanten beobachtet wurde. Da Extensine grundsätzlich sehr ähnlich aufgebaut sind, könnte für At1G23040 eine ähnliche Funktion in Betracht kommen.

Dafür wäre zunächst ein Nachweis der Lokalisation des At1G23040 Proteins an die Plasmamembran notwendig. Durch die Markierung mit GFP und die transiente Expression in Tabak sollte die subzelluläre Lokalisation des Proteins gezeigt werden. Die Fusion erfolgte am N-Terminus des Proteins, um die Funktion des vorhergesagten Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Ankers nicht zu beeinträchtigen. Dieser könnte die subzelluläre Lokalisation von At1G23040 maßgeblich beeinflussen. Eine mikroskopische Analyse der Fluoreszenz von GFP markiertem At1G23040<sub>Cvi-0</sub> oder At1G23040<sub>Ler-0</sub> zeigte jedoch, entgegen der Erwartungen, keine Membranlokalisation. Stattdessen war das Fusionsprotein im Zytosol lokalisiert. Das Protein wurde durch den GFP-Tag möglicherweise fehllokalisiert. Dies lag eventuell an der Größe des GFP, welches mit 27 kDa viel größer ist als At1G23040 mit 15 kDa. Andererseits könnte es auch zu einer Maskierung des Signal-Peptides gekommen sein, welches am N-Terminus vorhergesagt wurde [204]. Um die Lokalisation eines Tomaten AGP-1 zu untersuchen, welches wie auch das At1G23040 eine Signalsequenz und einen GPI Anker besitzt, konstruierten Zhao *et al.* 2002 einen Vektor bei dem das GFP zwischen die Signalsequenz und den Rest des Proteins gesetzt wurde. Im Anschluss daran konnte die Lokalisierung in den Bereich zwischen Zellwand und Plasmamembran gezeigt werden [214]. Diese Strategie sollte nun auch für das Gen At1G23040 verfolgt werden. Im Anschluss an eine neue Klonierung kann die Proteinlokalisierung zwischen den Ökotypen erneut verglichen werden. Zudem kann, durch die Deletion der GPI Anker-Anhangssequenz, der Einfluss des GPI Ankers auf die Lokalisierung bestimmt werden. Sun *et al.* zeigten 2003 den Einfluss der Deletion des GPI Ankers auf die Lokalisierung des Tomaten AGP-1. Dadurch war ableitbar, dass der GPI Anker wichtig für die partielle Fixierung des Proteins in der Zellmembran ist, dass das Protein aber auch ohne GPI Anker zur Plasmamembran lokalisiert. Dafür war vermutlich die (im vorliegenden Fall von GFP-At1G23040 maskierte) Signalsequenz verantwortlich [215]. Auch durch die Konstruktion eines neuen Fusionsproteins aus Signalpeptid-GFP-At1G23040<sub>Rest</sub> könnte die Größe des GFP die Funktionalität und die Lokalisation von At1G23040 beeinflussen. In den Untersuchungen von

Zhao *et al.* 2002 und Sun *et al.* 2004 wurde ein 50 kDa großes Protein mit GFP fusioniert [214, 215], was einem ganz anderen Protein zu Fluorophor Verhältnis entspricht. Um dies auszuschließen, könnte die Zn-Toleranz in transgenen Ler-0 Linien getestet werden, die das *Signalsequenz-GFP-At1G23040<sub>Cvi-0</sub>* Fusionsgen exprimieren. Zeigt sich eine partielle Komplementation der Zn-Sensitivität, wie durch die Expression von *At1G23040<sub>Cvi-0</sub>*, kann für die Lokalisierung des Fusionsproteins in Ler-0 geschlussfolgert werden, dass sie vermutlich nicht durch das GFP beeinflusst wird.

Durch die Untersuchung der Variation in der Zn-Toleranz von Cvi-0 und Ler-0 wurden zwei genomische Bereiche identifiziert, die für die Zn-Toleranz in *A. thaliana* entscheidend sind.

In einer Region konnte ein Kandidatengen: At1G23040 oder EXT31, identifiziert werden. Die Analyse der natürlichen Variation am At1G23040 Locus identifiziert 6 Haplotypen, welche auf ihren Einfluss auf die Zn-Toleranz hin untersucht werden müssen. So ließe sich der Einfluss der Einzelnen AS auf die Funktion von At1G23040 erfassen, wie es zum Beispiel für HMA3 gelang. Schließlich werden sich Analysen über die Funktion der At1G23040 Genvarianten in der Zn-Homöostase anschließen. Denkbar wären Effekte auf die Zellwandstruktur. Diese könnten durch eine Untersuchung der Zusammensetzung der Zellwand identifiziert werden. Auch elektronenmikroskopischen Analysen, könnten Unterschiede in der Struktur der Zellwand in Cvi-0 und Ler-0 erfassen. Um eine Rolle von At1G23040 in der Signaltransduktion zu analysieren sollte zunächst die subzelluläre Lokalisation von At1G23040 Varianten weiter analysiert werden.

Für die zweite Region zeigte sich eine partielle Komplementation der Zn-Sensitivität von Ler-0 durch zwei der Kandidatengene, ausgewählt aufgrund zwischenzeitlicher genetischer Eingrenzung des Intervalls und einer Priorisierung weniger Gene dieser Region aufgrund der Vorhersage nicht tolerierter AS Austausch. Eine Bestätigung dieses Phänotyps in einem weiteren System wird beweisen, ob es sich tatsächlich in allen drei Fällen um Zn-Toleranz vermittelnde Gene handelt.



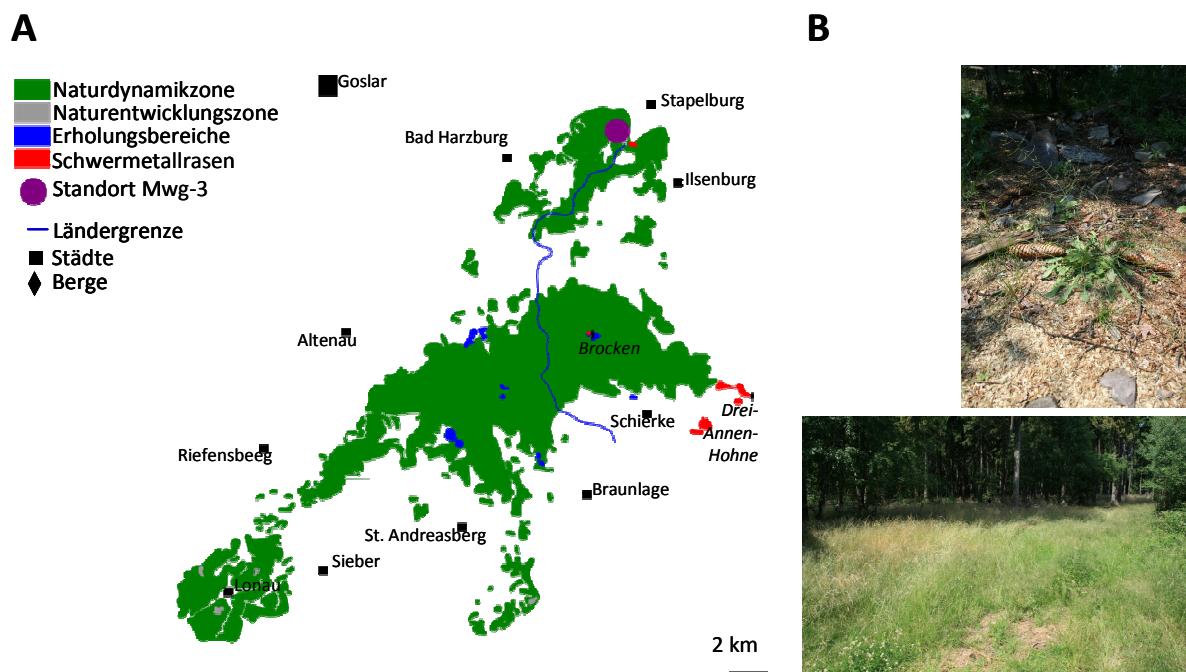
## **Teil 3**

**Ursachen der höheren Mangantoleranz des *A.*  
*thaliana* Ökotyps Mwg-3**

## 1. Einleitung

Der pH-Wert des Bodens verändert die Verfügbarkeiten von Schwermetallen stark. Ein saurer Boden hat eine wesentlich höhere Aluminium-, Eisen- und Mangan-Verfügbarkeit, dagegen eine geringere Verfügbarkeit von Makroelementen wie Phosphat, Kalzium und Stickstoff. Diese Situation stellt für Pflanzen, welche auf die Aufnahme höherer Mengen an Makro- als Mikroelementen angewiesen sind, ein Problem dar [216]. Dazu kommt die höhere Konzentration an Protonen in einem sauren Boden, welche auch direkt zur Schädigung der Pflanzen führen kann [42]. Diese Effekte, die kumulativ auf saurem Boden auftreten und eine Anpassung der Pflanzen an diese speziellen Umweltbedingungen erfordern, werden unter dem Begriff „acid soil syndrom“ zusammengefasst.

Der *A. thaliana* Ökotyp Mwg-3 wurde 2004, in einem naturbelassenen Teil des Nationalparks Harz, gefunden (Abb. 48). Auffällig an seinem Standort war der extrem geringe pH des Bodens von 3.63 welcher eine Anpassung an die Effekte des „acid soil syndroms“ erfordern sollte. Die Toleranzeigenschaften des Ökotyps wurden aus diesem Grund näher analysiert.



**Abb. 43:** Standort von Mwg-3 (**A**) in der schematischen Karte des Nationalparks Harz, erstellt nach einer Karte veröffentlicht am 26.5.2011 auf <http://www.nationalpark-harz.de/> [217] sowie nach Ranftl, 2009 [218]. Bei Naturdynamikzonen handelt es sich um vom Menschen nicht oder wenig beeinflusste Bereiche, bei Naturentwicklungszonen um ein Gebiet welches sich durch Renaturierungsmaßnahmen zur Naturdynamikzone entwickelt und bei Nutzungszonen um Flächen, die als kulturell wertvoll definiert wurden und deshalb Erholungs- (Erholungsbereiche) oder Bildungsfunktion (Schwermetallrasen) haben. (**B**) zeigt den Standort von Mwg-3 im Jahr 2008, sowie ein Individuum welches dort im Jahr 2007 beprobt wurde. GPS Koordinaten: N51° 52.232' E10° 38.612' nach der Diplomarbeit von Quirin Ranftl, 2009 [218].

Die Charakterisierung des Bodens (Tab. 24) am Standort von Mwg-3 ergab Zn-Gehalte von 300 µg/g. Dies ist im Vergleich mit dem mittleren Vorkommen von Zn in der Erdkruste von 80 mg/g ein relativ hoher Gehalt. Daneben ist auch Cd mit 4.7 mg/g im Boden angereichert. Dieser Wert entspricht dem 30fachen des mittleren Vorkommens in der Erdkruste. Auch für Blei konnte dieser Trend festgestellt werden. 550 µg/g entsprechen einer 50fachen Anreicherung. Zudem wurde wenig Phosphor im Boden gefunden. Nur ein hundertstel des mittleren Phosphorgehaltes wurde am Standort von Mwg-3 gemessen. Davon sind zudem, aufgrund des geringen pH-Wertes, nur 1/20 pflanzenverfügbar. Der Mangangehalt des Bodens ist mit 300 µg/g vergleichsweise gering ebenso die Gehalte von Nickel und Cobalt. Molybdän liegt mit 1.5 µg/g genau im mittleren Gehalt der Erdkruste.

**Tab. 24:** Metallgehalte des Bodens am Fundort von Mwg-3 angegeben in µg/g<sub>Tg</sub>. Daten erhoben von A. Trampczynska 2009, unveröffentlicht. Verfügbare Metalle mit HCl-Extraktion, Gesamtmetallgehalte mittels Königswasseraufschluss erfasst. 1: Angaben nach [www.webelemente.com](http://www.webelemente.com)

	Zn	Fe	Cu	Mn	Mo	Ni	Co	Cd	Mg	Ca	Au	Pb	P
Verfügbar	202	458.6	19.4	169.2	0	2.66	0.68	4.203	486.8	36.97	0.73	370.3	0.51
Total	301	17630	53.63	304.2	1.52	16.05	7.68	4.65	858.7	40.21	8.93	548.9	10.3
Max in org. Böden	250		113	2200	3.2	119	4.5	2.2				176	
Gehalt in der Erdkruste <sup>1</sup>	79	63000	68	1100	1.1	90	30	0.15	29000	50000	0.0031	10	1000

Wachstum unter den dokumentierten Bedingungen könnte bedeuten, dass Mwg-3 eine gute Anpassung an den sauren Standort zeigt, da das „acid soil syndrom“ durch die Metallgehalte des Bodens in seinen wachstumshemmenden Effekten noch verstärkt werden sollte. Demzufolge wurde von A. Trampczynska 2009 (unveröffentlicht) die Toleranz von Mwg-3 unter verschiedenen Metallkontaminationen getestet (Anhang Abb. 5). Mwg-3 zeigte unter Mn-Stress ein deutlich besseres Wachstum als Col-0 und Ler-0 und unter Mo-Stress ein geringfügig besseres Wachstum. Andere Metalle hatten keine signifikanten Unterschiede im Wachstum von Mwg-3 zur Folge. Untersucht wurde der Effekt von Zn, Fe-Mangel und Fe-Stress, Co, Cd, Ni und Cu. Da sich der Mn-Phänotyp von Mwg-3 am interessantesten präsentierte, wurde die Wurzellänge und Morphologie unter variierenden Mn-Konzentrationen weiter untersucht (Anhang Abb. 6). Dabei bestätigte sich die erhöhte Mn-Toleranz. Zudem zeigte sich eine vermehrte Wurzelhaarbildung bei Mwg-3 unter Kontrollbedingungen ohne MnSO<sub>4</sub> Zugabe. Durch eine Behandlung mit Mn reduzierte sich die Länge der Wurzelhaare in Mwg-3, andere Metalle hatten diesen Effekt nicht. Diese Experimente wurden dahingehen interpretiert, dass Mwg-3, ohne externe Mn-Versorgung, schnell Defizienzsymptome ausbildet. Die Metallgehalte in Blättern unterschiedlicher

Altersstadien, Stängeln und Schoten (Anhang Abb. 7) sowie Samen (Anhang Abb. 8) wurden analysiert. Vor allem die extrem hohen Mo-Gehalte in Blättern, Schoten und in Samen von Mwg-3 erregten hier Aufmerksamkeit. Die Mo-Gehalte der Samen waren dabei ca. 2fach erhöht gegenüber allen anderen getesteten Ökotypen. Zn-, Cd-, Mn- und Ni-Gehalte unterschieden sich kaum zwischen Mwg-0 und Col-0 Pflanzen. Nur der Fe-Gehalt von Mwg-3 wich noch von dem in Col-0 ab. In den Samen vielen außerdem leicht erhöhte Mn und Co-Gehalte auf. Für alle anderen untersuchten Metalle (Ni, Fe, und Zn) zeigten sich für Mwg-3 keine Abweichungen von Col-0.

Um eine mögliche Adaptation von Mwg-3 an den sauren Standort nachzuweisen, sollte der Ökotyp zunächst weiter phänotypisiert werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Eigenschaften, die unter dem acid soil syndrom fitnessrelevant sein könnten, d. h. eine Toleranz gegenüber Protonen, eine Al-Toleranz, eine verbesserte Phosphateffizienz und natürlich eine Mn-Toleranz, die weiter charakterisiert werden sollte. Außerdem sollten die der Mn-Toleranz zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufgeklärt werden.

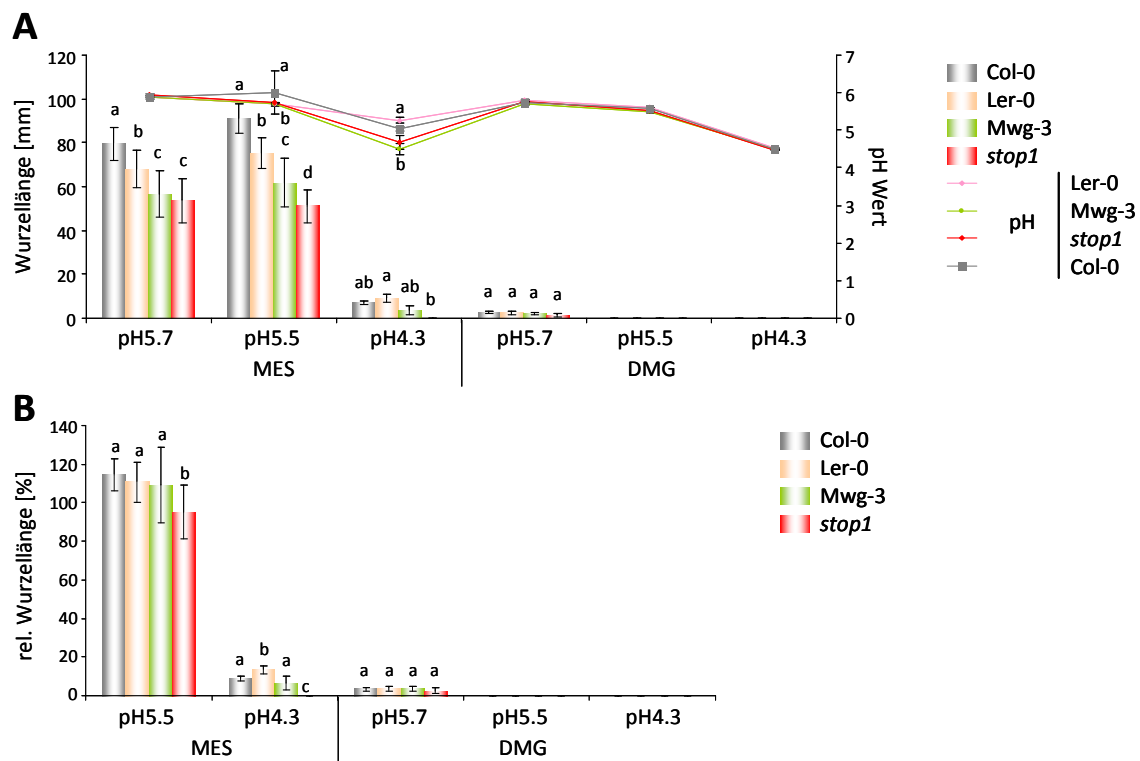
## **2. Ergebnisse**

### **2.1. Säuretoleranz von Mwg-3 im 6-well Flüssigsystem**

Um Hinweise auf eine mögliche lokale Adaptation an das natürliche Habitat finden zu können, sollte zunächst die Protonentoleranz von Mwg-3 erfasst werden. In früheren Arbeiten (Diplomarbeit Q. Ranftl, 2009 [218]) konnte die Säuretoleranz von Mwg-3 nur auf saurer Erde repliziert werden. In einem artifiziiellern, besser kontrollierbaren System gelang dies noch nicht. Das flüssig-6-well System wurde zur Erfassung des Wachstums verwendet. Nach 7 Tagen Wachstum wurden die Wurzellänge und der pH des Mediums erfasst (Abb. 44 A). Neben dem (Standard) 1/10 Hoagland Medium, wurde ein Medium gepuffert mit Dimethylglyoxim (DMG) statt des üblichen MES Puffers verwendet. Andere Komponenten wurden dabei im Vergleich zum 1/10 Hoagland Medium nicht verändert. Der pH wurde, basierend auf vorangegangenen Versuchen, von standardmäßig 5.7 auf 5.5 und 4.3 reduziert. Für Mwg-3 und die Referenzökotypen Col-0 und Ler-0, konnten in früheren Versuchen deutliche Effekte auf das Wurzelwachstum erst ab einem pH von wenigstens 4.0 erzeugt werden [218]. Aus diesem Grund wurde das Wachstum bei dem pH-Wert von 4.3 analysiert um auch hier eine ca. halbmaximale Inhibition für den Referenzökotyp Col-0 zu erhalten. Bei pH 5.5 sollte eine möglichst 50 % Wachstumsreduktion für *stop1* erreicht werden. *stop1* dient in diesem System als Positivkontrolle für Säurestress-Sensitivität. Bei dieser Mutante ist ein Protein der Signaltransduktion, welche  $\text{Al}^{3+}$ - und  $\text{H}^{+}$ -responsive Genexpression reguliert, in seiner Aminosäuresequenz verändert, was zu einer Säuresensitivität führt [42, 219]. Eine Reduktion des pH-Wertes um 0.2 Einheiten bewirkte für die *stop1*-Mutante bereits eine Reduktion des rel. Wurzelwachstums (Abb. 44 B), während die Ökotypen Col-0, Ler-0 und Mwg-3 nicht auf den leichten Säurestress reagierten. Bei einem starken Säurestress ist kein Wachstum für *stop1* mehr zu verzeichnen. Das relative Wachstum von Mwg-3 ist dagegen nicht stärker als das von Col-0 oder Ler-0. Im Gegenteil kann für Ler-0 sogar eine leicht erhöhte Säuretoleranz aufgrund eines, im Vergleich zu Mwg-3 und Col-0, signifikant besseren Wachstums nachgewiesen werden. Der alternativ verwendete DMG Puffer erwies sich als toxisch für die Pflanzen bereits bei normalem pH.

Eine Reduktion auf 5.5 verhinderte die Keimung aller Pflanzen. Die Überprüfung des pH-Wertes des Mediums nach dem Wachstum ergab Unterschiede zwischen den Behandlungen, obwohl die Pflanzen durch Wurzelexudate den pH der Medien leicht verändert hatten. Die Reduktion in der Wurzellänge ist somit auf die Protonenkonzentration zurückführbar.

Erneut konnte keine Säuretoleranz von Mwg-3 nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die pH Toleranz von Mwg-3 in einem artifiziiellen System nicht erfassbar.

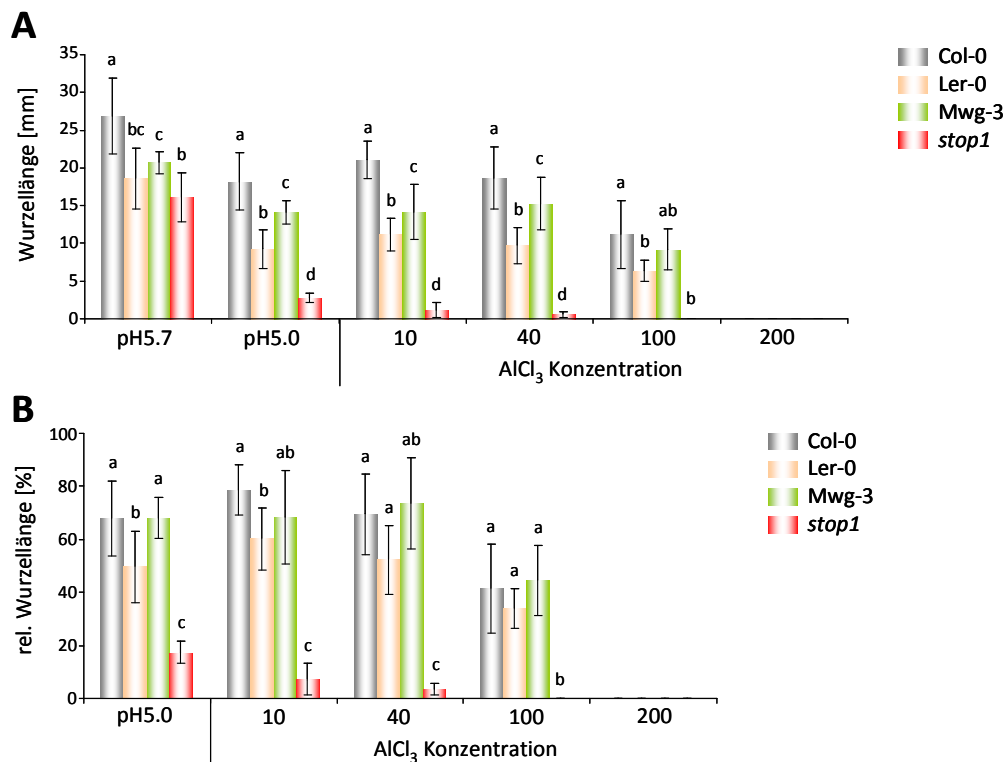


**Abb. 44:** Darstellung der Säuretoleranz von Mwg-3 im Vergleich mit den *A. thaliana* Ökotypen Col-0, Ler-0 sowie der Mutanten *stop1* bei drei verschiedenen pH-Werten, in flüssig Systemen gepuffert mit MES oder DMG. In **(A)** ist neben dem mittleren, absoluten Wurzelwachstum (linke Achse) auch der mittlere pH des Mediums nach Ende der Experimente (rechte Achse) dargestellt. MW  $\pm$  SD **(B)** Angegeben sind relative Wurzellängen bezogen auf das Wachstum unter Kontrollbedingungen im 1/10 Hoagland Medium bei einem pH von 5.7, gepuffert mit MES. Signifikante Unterschiede zwischen Genotypen (A-B) wurden ermittelt durch eine Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test, unterschiedliche Buchstaben definieren Gruppen mit  $p < 0.05$  signifikanten Unterschieden, innerhalb einer Behandlung, an. n = 6-27

## 2.2. Aluminiumtoleranz von Mwg-3 im 6-well Flüssigsystem

Neben der Toleranz gegenüber Protonen könnte eine Adaptation an einen sauren Standort, auch durch eine erhöhte Al-Toleranz nachzuweisen sein. Sie wurde aus diesem Grund im flüssig-6-well System getestet. Da die Verfügbarkeit von Al ab einem pH von 5.0 deutlich

besser ist als bei 5.7 [216] wurde der pH des 1/10 Hoagland Mediums auch für diesen Versuch leicht reduziert. Durch diese Reduktion war eine drastische Beeinträchtigung des Wachstums von *stop1* nachweisbar (Abb. 45). Dies wurde als eine Bestätigung des Versuchsaufbaus gewertet.



**Abb. 45:** Graphische Darstellung der Al-Toleranz von Mwg-3 durch Wachstumsversuche. Das Wurzelwachstum der *A. thaliana* Ökotypen Col-0, Ler-0 und Mwg-3 sowie der Mutanten *stop1* wurde in Standard Medium (1/10 Hoagland pH 5.7), unter reduziertem pH und mit unterschiedlichen AlCl<sub>3</sub> Konzentrationen erfasst. In **(A)** ist das mittlere, absolute Wachstum, MW ± SD, dargestellt. **(B)** Angegeben sind relative Wurzellängen bezogen auf das Wachstum unter Kontrollbedingungen im 1/10 Hoagland Medium bei einem pH von 5.7, gepuffert mit MES. Signifikante Unterschiede zwischen Genotypen (A-B) wurden ermittelt durch eine Zweifeld-Varianzanalyse mit Tukey Test, unterschiedliche Buchstaben definieren Gruppen mit  $p < 0.05$  signifikanten Unterschieden, innerhalb einer Behandlung, an. n = 4-14

Mwg-3 wies erneut keine höhere pH-Toleranz auf als Col-0 (Abb. 45 B). Ler-0 reagierte in diesem Versuch anders auf den Protonenüberschuss, es zeigte sich eine pH-Sensitivität. Durch einen zusätzlichen Al-Stress von 100 μM verringerte sich das rel. Wurzelwachstum von Col-0, Ler-0 und Mwg-3 auf 40 %. Bei höheren Konzentrationen überlebten die Keimlinge nicht. Für *stop1* konnten bereits ab Konzentrationen von 100 μM keine überlebenden Keimlinge mehr gefunden werden.

Um neben der Wurzellänge einen weiteren Indikator für Toleranz zu erfassen, wurden Zellschäden in der Wurzel mittels Propidiumiodid (PI) Färbung nachgewiesen. PI, ein positiv

geladener Nukleinsäurefarbstoff, kann in Zellen deren Membranen geschädigt sind eindringen und bindet hier an Nukleinsäuren. Daraufhin ist eine Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop detektierbar. Membranen intakter Zellen können dagegen nicht von dem Farbstoff passiert werden und die Zellen bleiben ungefärbt [220]. Für diesen Versuch wurden Keimlinge für 6 Tage unter Kontroll- bzw. den jeweiligen Stressbedingungen angezogen und die geschädigten Wurzelzellen anschließend gefärbt. Dabei konnte der Wachstumsphänotyp vorheriger Versuche reproduziert werden (Anhang Abb. 9). Die *stop1*-Mutante zeigte bei Reduktion des pH eine deutliche Verringerung in der Wurzellänge auf  $14 \pm 5 \%$  und durch Al-Behandlung eine weitere Reduktion auf  $2.6 \pm 0.9 \%$ . Die Ökotypen unterschieden sich erneut kaum in ihrer Wurzellänge in Antwort auf die pH Reduktion und die Al-Behandlung.

Mikroskopisch war der starke Effekt der gewählten Behandlung auf die Mutante *stop1* anhand der frühen Verzweigung der Hauptwurzel erkennbar. Die Färbung mit PI im Bereich der Wurzelspitzen war dagegen nicht eindeutig stärker als bei den Ökotypen Mwg-3, Col-0 und Ler-0. Auch durch die Quantifizierung der Wurzelschädigung, durch Zählung der PI-gefärbten Zellen im Bereich der Wurzelspitze, konnten die Säure- und Aluminiumtoleranzen der Ökotypen nicht bestätigt werden. Steigende Al-Konzentration führen zu einer Zunahme der Schäden an der Wurzel, was durch eine Zunahme der Anzahl an angefärbten Kernen nachweisbar war. Jedoch wies die Säure- und Al-sensitive Mutante *stop1*, entgegen vorheriger Beobachtungen, in dieser Quantifizierung die geringsten Schädigungen auf. Die Erfassung der Al-Toleranz mit der PI Färbung war demnach nicht verlässlich genug um auf Unterschiede in der Al-Toleranz der Ökotypen zu schlussfolgern. So war die beobachtete höhere Schädigung der Mwg-3 Wurzeln unter  $10 \mu\text{M AlCl}_3$  nicht konsistent mit den Ergebnissen anderer Versuchen und spiegelte vermutlich nicht die tatsächliche Situation wieder. Für Ler-0 konnten dagegen keine Unterschiede in der (rel.) Anzahl an gefärbten Zellen zu Col-0 festgestellt werden. Auch hier unterschieden sich die Ergebnisse von denen ermittelt durch die Wurzellänge (Abb. 45 A, B).

Neben einer Stressdauer von 6 Tagen, wurden auch Versuche mit kurzzeitigen Stressapplikationen für nur 3 Stunden und anschließender Färbung geschädigter Zellen durchgeführt. In keinem Versuchsaufbau konnte jedoch eine signifikant höhere Schädigung der *stop1*-Mutante, durch eine PI Färbung quantifiziert werden. Auch zwischen den

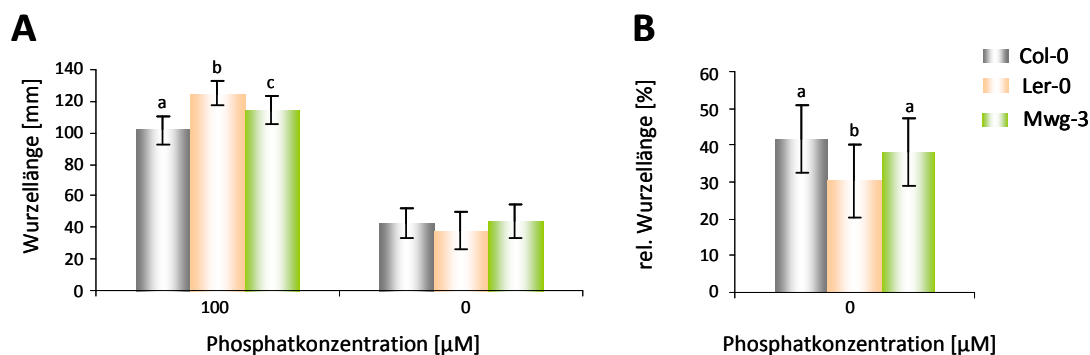


Ökotypen konnten keine Unterschiede in der Toleranz dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt).

Fazit dieser Versuchsreihe: Mwg-3 bildet unter Al-Stress keine längeren Wurzel aus als Col-0 oder Ler-0 und ist demnach nicht Al-toleranter.

### 2.3. Phosphateffizienz von Mwg-3

Weder eine Protonen- noch eine A-Toleranz konnte für Mwg-3 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Symptom des „acid soil syndroms“ analysiert. Durch die Verringerung der Phosphatverfügbarkeit in sauren Böden [216], sowie des ohnehin schon niedrigen Phosphorgehaltes am Standort von Mwg-3 (Tab. 24) sollte eine an den Standort angepasste Pflanze eine höhere Phosphateffizienz besitzen als Pflanzen an phosphatreichen Standorten.

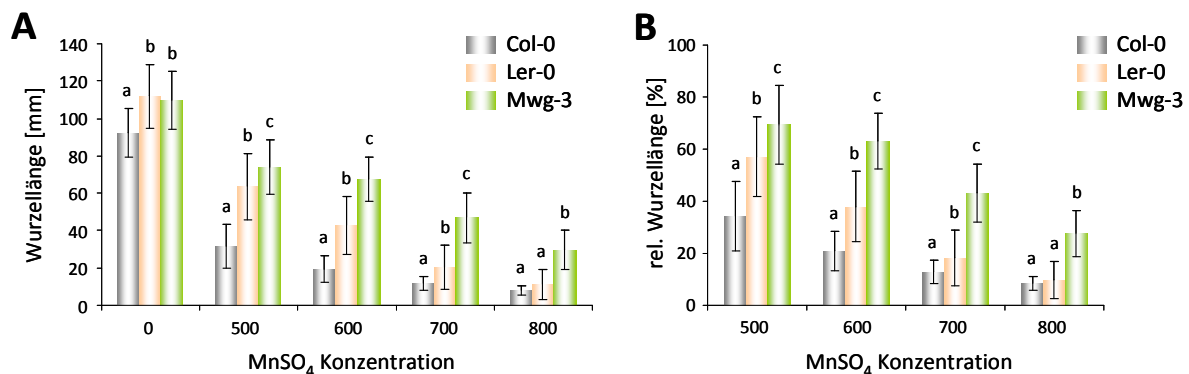


**Abb. 46:** Wurzelwachstum der *A. thaliana* Ökotypen Col-0, Ler-0 und Mwg-3 unter Phosphatmangel im Vergleich zum Kontrollwachstum. **(A)** MW  $\pm$  SD des absoluten Wachstums. **(B)** MW  $\pm$  SD der relativen Wurzellängen bezogen auf das Wachstum unter Kontrollbedingungen. Signifikante Unterschiede zwischen Ökotypen in (A) wurden ermittelt durch eine zweiwege-Varianzanalyse und in (B) durch eine Einwege-Varianzanalyse mit Tukey Test, unterschiedliche Buchstaben definieren Gruppen mit  $p < 0.05$  signifikanten Unterschieden, innerhalb einer Behandlung, an. n = 14-25

Das Wachstum von Mwg-3 wurde mit dem Wachstum von Col-0 und Ler-0 unter Phosphatmangel verglichen, bei dem eine effizientere Pflanze ein besseres Wachstum zeigen sollte. Mwg-3 erwies sich jedoch nicht als phosphateffizienter als Col-0 (Abb. 46). Signifikant unterschiedlich in der Phosphateffizienz war dagegen nur Ler-0. Dieser Ökotyp wuchs schlechter unter Phosphatmangel, bei besserem Wachstum unter Kontrollbedingungen.

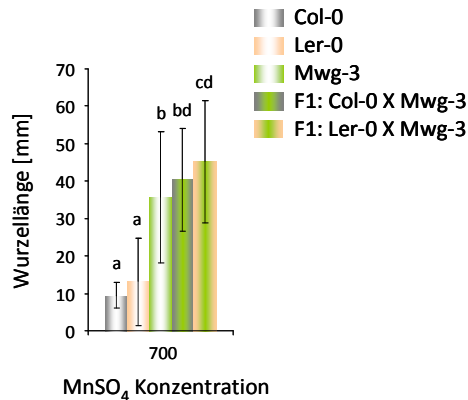
## 2.4. Mangantoleranz von Mwg-3

Als viertes Symptom des „acid soil syndroms“ wurde die Mn-Toxizität untersucht. Für eine höhere Toleranz des Ökotyps Mwg-3 gab es bereits im Vorfeld Hinweise (vgl. Anhang Abb. 5). Die Toleranz der drei Ökotypen Col-0, Ler-0 und Mwg-3 wurde deshalb auf unterschiedlichen  $\text{MnSO}_4$  Konzentrationen getestet (Abb. 47). Dabei konnte eine dosisabhängige Reduktion des Wurzelwachstums für alle drei Ökotypen dokumentiert werden. Für Mwg-3 konnte die Mn-Toleranz unter allen getesteten Konzentrationen bestätigt werden. Bei dieser Toleranz handelt es sich möglicherweise um eine Adaptation von Mwg-3 an den sauren, Mn-reichen Standort.



**Abb. 47:** Wachstum von Mwg-3 unter Manganstress im Vergleich mit den Ökotypen Col-0 und Ler-0. **(A)** Graphische Darstellung des mittleren ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ) Wurzelwachstums unter 4 verschiedenen  $\text{MnSO}_4$  Konzentrationen im Vergleich zum Wachstum unter Kontrollbedingungen. **(B)** zeigt das relative, mittlere Wurzelwachstum ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ) in Referenz zum Wachstum unter Kontrollbedingungen. Signifikante Unterschiede in (A-B) wurden ermittelt durch Zweifache-Varianzanalysen mit Tukey Test.  $n_{\text{Total}} = 42-133$  aus drei biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede (d. h.  $p < 0.001$ ) zwischen Ökotypen sind gekennzeichnet durch unterschiedliche Buchstaben.

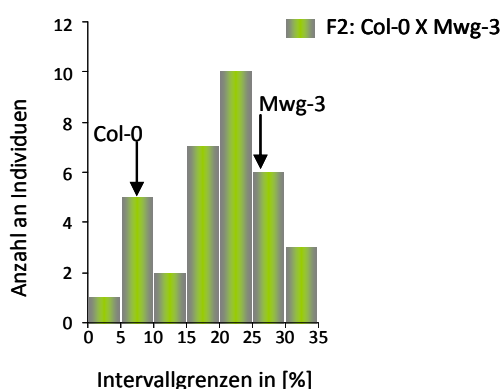
Um die zugrunde liegende genetische Ursache für die bessere Toleranz aufzuklären, wurde Mwg-3 mit Col-0 und Ler-0 gekreuzt, und das Wachstum der F1 unter 700  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  erfasst. In dieser heterozygoten Generation, sollte ein Mwg-3 ähnliches Wachstum für einen, oder mehrere dominante Loci sprechen, welche für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sind. Ein Col-0 bzw. Ler-0 ähnliches Wachstum spräche für einen rezessiven Locus, ein Wachstum welches zwischen dem der beiden Eltern liegt für einen intermediären Locus oder mehreren Loci mit Effekt auf die Mn-Toleranz. Es zeigte sich, dass beide Kreuzungen ein F1 Generation produzierten, welche ein Mwg-3 ähnliches Wachstum unter Mn-Stress zeigte (Abb. 48).



**Abb. 48:** Graphische Darstellung des Wachstums von F1 Nachkommen der Kreuzung von Mwg-3 mit Col-0 oder Ler-0 unter 700 µM  $\text{MnSO}_4$ . Statistisch signifikant ( $p < 0.05$ ) unterschiedliche Gruppen sind dabei gekennzeichnet durch unterschiedliche Kleinbuchstaben. Errechnet wurden diese mittels Einwege-Varianzanalyse und Tukey Test,  $n = 31-135$  aus 2 unabhängigen Experimenten.

Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass der Mn-Toleranzloкус in Mwg-3 dominant ist. Da sich die beiden Kreuzung phänotypisch nicht unterschieden, wurde im Folgenden nur die Kreuzung mit dem Referenzökotyp Col-0 weiter untersucht.

Als nächstes wurde die F2 analysiert. In dieser Generation wurde die Verteilung des Wurzelwachstums erfasst (Abb. 49). Es zeigte sich eine leichte Verschiebung hin zu längeren Wurzeln. Das Verhältnis von sensitiven zu intermediären zu toleranten Individuen lag bei 7:16:11 (1:2.2:1.5). Dies entsprach tendenziell einem intermediären Erbgang, anders als die Analyse der F1 vermuten ließ.



**Abb. 49:** Graphische Darstellung des Wachstums von F2 Nachkommen der Kreuzung von Mwg-3 mit Col-0. Gezeigt ist das Histogramm des relativen Wachstums der F2 unter Mn-Stress.  $n = 34$ .

Jedoch charakterisieren die Mendelschen Gesetze nur die einfachsten genetischen Situationen. Es werden dabei zum Beispiel epistatische Interaktionen zwischen den Loci

außer Acht gelassen. Des Weiteren kann eine Situation in welcher sehr viele Loci Anteil am Phänotyp haben, nicht mehr durch die Mendelschen Gesetze beschrieben werden.

### 2.4.1. Mapping der Mn-Toleranz mittels BSA

Um die Gene welche in Mwg-3 für die Mn-Toleranz verantwortlich sind zu identifizieren, wurde eine „*Bulk Segregant Analysis*“ (BSA) durchgeführt. In dieser Analyse wird eine Population mit einem segregierenden Locus, der zu einem deutlichen phänotypischen Unterschied führt, benötigt. Dieser wird mit Sequenzunterschieden in der Population korreliert um den oder die verantwortlichen Locus/Loci zu mappen. Für ein BSA werden zwei Pools an Individuen der F2 gebildet. Einer der Pools vereint F2-Pflanzen welche die relevante Eigenschaft ausprägen (in diesem Fall die Mn-Toleranz von Mwg-3). Individuen in dem anderen Pool prägen diese Eigenschaft nicht aus (Mn-Sensitivität wie Col-0). Die Hybridisierung der genomischen DNA der beiden Pools auf zwei *ATH1* Gene Chip erzeugt zufällige Signalunterschiede an jeder Position des Genoms außer derjenigen, die verantwortlich für die Ausprägung des Phänotyps ist, welcher der Selektion zugrunde liegt [221]. So kann eine Region eingegrenzt werden, in welcher das für den Phänotyp (mit-) verantwortliche Gen liegen sollte.

Die beiden Pools welche in der F2 der Col-0 X Mwg-3 Kreuzung gebildet wurden enthielt 31 Individuen die auf 600  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  das beste Wachstum unter 480 Pflanzen zeigten. Der Andere enthielt 39 Individuen welche auf 300  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  das kürzeste Wurzelwachstum unter 400 Individuen zeigten. Für den „schlechten“ Pool wurde die  $\text{MnSO}_4$  Konzentration verringert, da sich die schlecht wachsenden Pflanzen nach der Selektion mit 600  $\mu\text{M}$  nicht erholten. Die gDNA aller Individuen eines Pools wurde auf einen *AtH1 gene chip*<sup>®</sup> hybridisiert und die Signale der beiden Chips verglichen. Die Selektion sollte eine Anreicherung eines (oder mehrerer) Mwg-3 Allels in dem toleranten Pool zur Folge haben. Diese(s) sollte eine andere Sequenz als das korrespondierende Col-0 Allel aufweisen. Das Col-0 Allel wäre dagegen im intoleranten Pool angereichert. Diese Sequenzunterschiede sollten sich in einem unterschiedlichen Signal zwischen den beiden Hybridisierungen widerspiegeln. Das Signalverhältnis wurde für jedes Gen aus den logarithmierten, normalisierten Daten kalkuliert. Es wurden keine Signalunterschiede in einem speziellen genomischen Bereich

sichtbar. Um die gewählte Auswertungsmethode zu überprüfen wurde die Analyse mit online verfügbaren .cel Dateien für F2 Individuen aus einer Ler-0, Col-0 Kreuzung getestet. Das Ergebnis der Analyse wurde mit den publizierten Analysen verglichen. Dabei ergaben sich erhebliche Abweichungen zu der publizierten Mapping Analyse [221, 222]. Die Region welche die SNP Anreicherung enthielt, konnte nicht wie publiziert detektiert werden. Es muss geschlussfolgert werden, dass mit dem momentan vorhandenen Datensatz und den vorliegenden bioinformatischen Programmen und Protokollen, eine Auswertung noch nicht möglich ist.

### 2.4.2. Mapping der Mn-Toleranz mittels „Next Generation Sequencing“ (NGS)

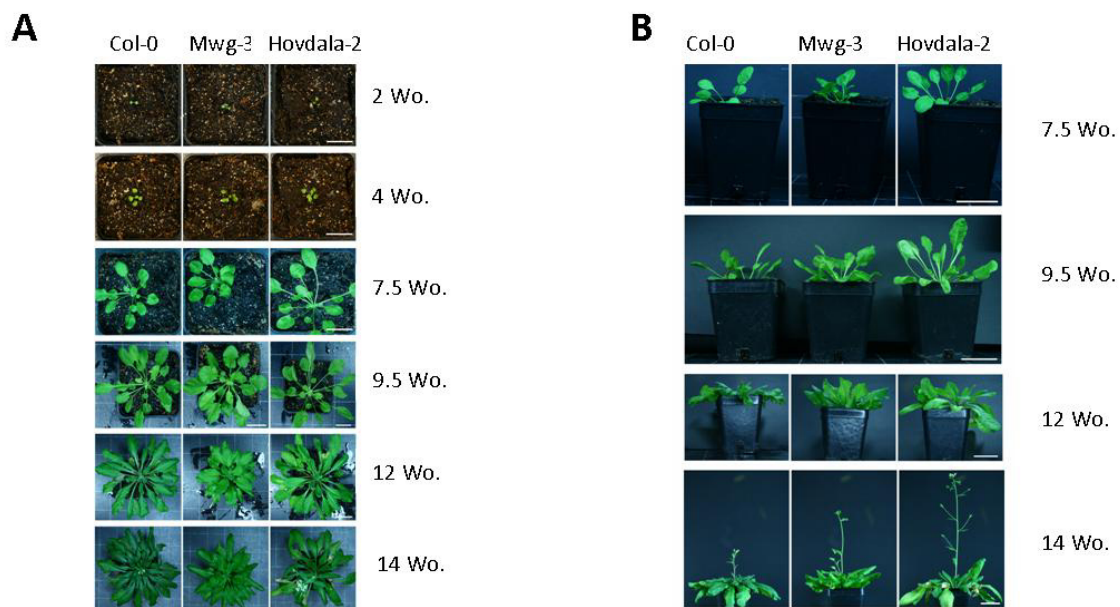
Ein weiteres Vorgehen zur Analyse der dem Mn-Toleranzphänotyp zugrunde liegenden genetischen Situation war die Sequenzierung von Mwg-3, sowie zweier Pools aus Mn-toleranten und –intoleranten F2 Individuen.

Die Sequenzierung des Ökotyps und die Assemblierung der kurzen Sequenzfragmente wurde durchgeführt von David Ries und fand an der Universität Bielefeld im „Centrum für Biotechnologie“ (CeBiTec) unter Aufsicht von Prof. Dr. Weisshaar statt. Sie ermöglichte die Detektion von Sequenzunterschieden zwischen Mwg-3 und Col-0. Es wurden 0.5 Millionen SNPs und mehr als 100 tausend kleine Insertionen und Deletion (Indels) zwischen Col-0 und Mwg-3 detektiert. Ein auf den genomweiten SNPs basierender Verwandtschafts-Baum, zeigte eine hohe Ähnlichkeit der Mwg-3 Sequenz zur Sequenz von Hovdala-2, einem schwedischem Ökotyp. Diese beiden unterschieden sich nur in 1593 SNPs. Durch klassische Sequenzierungen wurden einige dieser Unterschiede überprüft (Anhang Abb. 10). Dabei ergaben sich eindeutige Unterschiede in der Mwg-3 Sequenz im Vergleich zu Hovdala-2. Demzufolge handelt es sich bei dem Ergebnis des NGS nicht um Fehldetektion von SNPs. Mwg-3 ist somit ein unabhängiger Ökotyp der eng mit Hovdala-2 verwandt ist. In Tab. 25 ist das Ergebnis der NGS Sequenzierung und das der konventionellen Sequenzierung mit der in der *1001 genomes* Datenbank hinterlegten Sequenz verglichen.

**Tab. 25:** Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit der *1001 genomes* Datenbank [185].

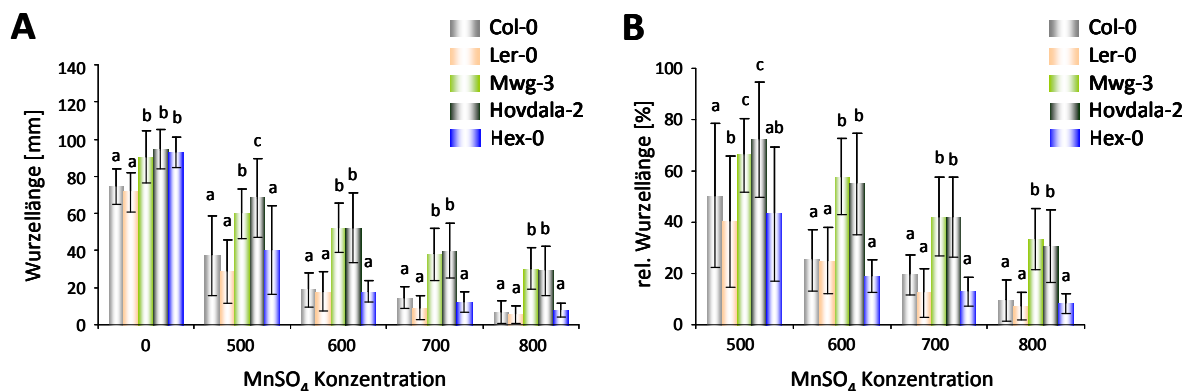
Chromosom	Position	1001genomes.org Referenz		NGS	konventionelle Sequenzierung		
		Col-0	Hovdala-2	Mwg-3	Col-0	Hovdala-2	Mwg-3
1	11289552	G	C	G/A	G	C	G
1	11289705	C	A	C/G	C	A	G
1	11289711	T	C	G/A	T	C	A
1	11289717	C	A	T/A	T	A	A
1	11290015	T	T	C/G	A	T	A
3	11685100	G	R	T	G	-	T
3	11685487	G	A	C	G	A	C
3	11685533	T	A	G	T	A	G
3	11685856	G	T	A	G	T	A
3	11686511	A	C	G			
3	11686519	A		T			
5	3578374	A	C	T	A	A	A
5	3578392	G	A	T	G	G	G

Neben dem Nachweis sequenzieller Unterschiede, die zeigen, dass es sich bei Mwg-3 um einen neuen Ökotyp handelt, ist auch ein Vergleich des Phänotyps von Mwg-3 mit Col-0 und Hovdala-2 aufschlussreich (Abb. 50). Die Pflanzen wurden aus diesem Grund unter gleichen Bedingungen angezogen. Für ca. 4 Wochen entwickelten sich die Pflanzen gleich. Nach 7 Wochen wurden erste Unterschiede deutlich. Mwg-3 entwickelte kürzere, Hovdala-2 längere Blattstiele im Vergleich zu Col-0.



**Abb. 50:** Dokumentation der Entwicklung der *A. thaliana* Ökotypen Col-0, Mwg-3 und Hovdala-2. Die Entwicklung der Pflanzen erfolgte für 7 Wochen unter Kurztagbedingungen. Unter Langtagbedingungen erfolgte anschließend die Blüteentwicklung. **(A)** Dokumentation der Blattrosette. Maßstab bei 2 bis 9.5 Wochen entspricht 1.6 cm. Maßstab bei 12 und 14 Wochen entspricht 2.5 cm. **(B)** Dokumentation der Blütenentwicklung. Maßstab entspricht 2.5 cm.

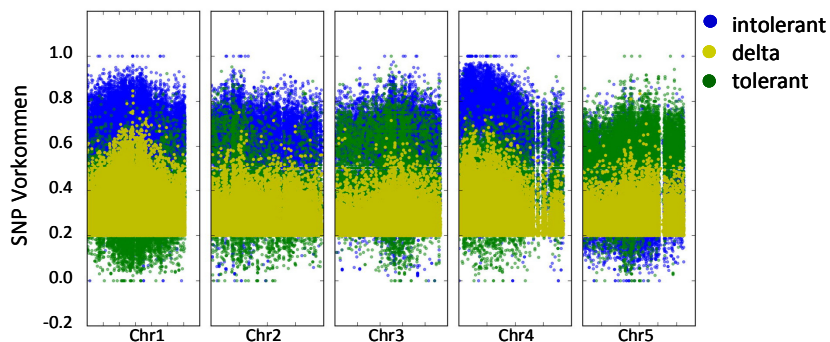
Nach 9 Wochen war ersichtlich, dass Mwg-3 eine buschigere Rosette, mit weiterhin deutlich kürzeren Blattstielen und rundlicheren Blättern ausbildete als Col-0 oder Hovdala-2. Die Induktion der Blüte erfolgte bei allen drei Ökotypen im gleichen Zeitraum nach ca. 14 Wochen, von welchen die Pflanzen die ersten 7 Wochen unter Kurztagbedingungen (8h Licht/ 16h Dunkelheit) und anschließend bei Langtagbedingungen (16h Licht / 8h Dunkelheit) angezogen wurden. Wie Mwg-3 war Hovdala-2 Mn-tolerant. Dies zeigte ein Wachstumsversuch bei welchem die Keimlinge für 14 Tage mit 500 bis 800  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  gestresst wurden (Abb. 51). Wie bereits in vorherigen Versuchen zeigte Mwg-3 eine höhere Toleranz und wuchs signifikant länger als Col-0 oder Ler-0. Dies zeigte sich sowohl im absoluten, als auch im rel. Wachstum.



**Abb. 51:** Vergleich der Mn-Toleranz von Mwg-3 und Hovdala-2. **(A)** Graphische Darstellung des mittleren (MW  $\pm$  SD) Wurzelwachstums unter 4 verschiedenen  $\text{MnSO}_4$  Konzentrationen im Vergleich zum Wachstum unter Kontrollbedingungen. **(B)** zeigt das relative, mittlere Wurzelwachstum (MW  $\pm$  SD) in Referenz zum Wachstum unter Kontrollbedingungen. Signifikante Unterschiede in (A-B) wurden ermittelt durch Zweifach-Varianzanalysen mit Tukey Test.  $n_{\text{Total}} = 14-60$  aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede (d. h.  $p < 0.001$ ) zwischen Ökotypen sind gekennzeichnet durch unterschiedliche Buchstaben.

Das Wachstum von Hovdala-2 war in diesem Versuch identisch zu dem von Mwg-3. Dagegen ist ein weiterer Ökotyp, Hex-0, gesammelt bei 51°54.05' N, 10°39.065' E in der Nähe der ursprünglichen Mwg-3 Fundstelle, nicht Mn-tolerant. Dies unterstreicht, dass es sich bei der Mn-Toleranz von Mwg-3 und Hovdala-2 nicht um eine generelle Toleranz von *A. thaliana* gegenüber Mn handelt. Es zeigt auch, dass Col-0 und Ler-0 nicht besonders Mn-sensitiv sind. Stattdessen weisen Mwg-3 und Hovdala-2 tatsächlich eine besonders hohe Mn-Toleranz auf. Die Sequenzierung von Mwg-3 bildete die Voraussetzung für eine Mappinganalyse durch eine Sequenzierung von Mn-toleranten und Mn-intoleranten Pools. Diese wurde ebenfalls durchgeführt von David Ries an der Universität Bielefeld im „Centrum für Biotechnologie“ (CeBiTec) unter Aufsicht von Prof. Dr. Weisshaar. Durch NGS konnten SNPs in den Pools

detektiert werden. Eine Anhäufung von Mwg-3 SNPs in einer konkreten genomischen Region im „toleranten Pool“ würde auf die Position des verantwortlichen Gens hinweisen. In Kombination mit dem Ergebnis des BSA Mappings sollte so eine Liste von Kandidatengenen etabliert werden. In Abb. 52 ist das Ergebnis der SNP Detektion in dem toleranten (grün) und intoleranten (blau) Pool graphisch dargestellt. Diese vorläufige Auswertung der Sequenzierungsergebnisse zeigt die Verteilung der Mwg-3 charakteristischen SNPs, in den Pools, in Abhängigkeit von deren chromosomaler Position.



**Abb. 52:** Resultat des SHOREmap Mappings der Mwg-3 Mn-Toleranz auf Basis der F2 Pools aus Mn-toleranten und Mn-intoleranten Individuen. Von 324461 SNPs welche Mwg-3 von Col-0 unterscheiden ist das das jeweilige Vorkommen in den Mn-intoleranten (blau) und Mn-toleranten (grün) Pools in Abhängigkeit von der chromosomalen Position dargestellt. Der Unterschied in der Anhäufung von SNPs zwischen den Pools ist als Delta (gelb) aufgetragen. Eine gleichmäßige Verteilung der SNPs zwischen den Pools, wie sie in den Bereichen außerhalb der phänotypverursachenden Region erwartet wird, entspricht 0.5. Daten generiert von David Ries CeBiTec Universität Bielefeld, *Faculty of Biology / Genomforschung* unter der Leitung von Prof. Dr. Weisshaar.

Das Ergebnis dieser Analyse lieferte keinen eindeutig identifizierbaren *Peak* in dem Unterschied in der SNPs Verteilung (delta: gelb). Dieser sollte am verantwortlichen Locus 1 erreichen. Dies entspräche einer 100%igen Anreicherung eines Mwg-3 SNPs in Abhängigkeit von dem Mn-Toleranzphänotyp. Die Sequenzierung der F2 Pools kann somit nicht zur Verkürzung der Liste von Kandidatengenen herangezogen werden.

In Bezug zur Metallhomöostase annotierte Gene (pers. Kommunikation Singh *et al.*) wurden auf Sequenzunterschiede zwischen Mwg-3 und Col-0 hin überprüft. Allein die Detektion von Insertionen und Deletionen ergab Unterschiede in 131 von insgesamt 243 „Metallgenen“. Darunter zum Beispiel *PCS1*, *PCS2* oder *ABCC1* und *ABCC2*. Auch die *HMA* Gene sind vertreten mit *HMA1*, *HMA4*, *HMA5*, *HMA6*, *HMA7* und *HMA8*. Für eine endgültige Aussage werden die Insertionen und Deletionen (Indels) nun klassifiziert. Dabei ist für die Proteinfunktionalität zunächst einmal eine Veränderung der AS-Sequenz relevant. Es werden demnach Indels in Exons vor denjenigen in den Introns und regulatorischen Bereichen



priorisiert. Dazu kommt die Information über die Anzahl der betroffenen Nukleotide im Exon der Gene. Sind ein Vielfaches von 3 Nukleotiden verändert, wird die Indel dadurch in ihrer Priorität herab gestuft, da sich keine Verschiebung im Leseraster ergibt und nur einzelne AS in der Proteinsequenz verändert werden. Dazu kommen Informationen über SNPs. Hier werden zunächst die Metallgene identifiziert werden, welche sich in einem SNP zwischen Mwg-3 und Col-0 unterscheiden. Anschließend wird eine SIFT Analyse erfassen, welcher dieser SNPs zu einem nicht tolerierten AS Austausch in Mwg-3 führt, oder welcher möglicherweise eine nicht-tolerierte AS in der Col-0 Referenzsequenz betrifft, die dadurch im Mwg-3 Protein toleriert wird.

### 3. Diskussion

Der 2004 entdeckte *A. thaliana* Ökotyp Mwg-3 ist vor allem aufgrund der Bodencharakteristika seines Habitates interessant. Der Schwermetallgehalt des sauren Bodens (pH 3.63), mit einem organischen Anteil von 44.7 % [218], wurde analysiert, und sehr geringe Phosphor- und sehr hohe Blei- und Cadmium-Gehalte wurden gemessen. Daneben waren die Gehalte von Eisen, Nickel, Co und Ca relativ gering, Cd und Zn-Gehalte dagegen vergleichsweise hoch. Die herausragendste Eigenschaft des Bodens, der saure pH-Wert, legte die Vermutung nahe, dass Mwg-3 in seinem natürlichen Habitat mit dem „*acid soil syndrome*“ konfrontiert wurde. Dieses beschreibt, dass auf einem sauren Boden nicht nur der Überschuss an Protonen problematisch für das Pflanzenwachstum ist. Der geringe pH führt auch zu einer höheren Verfügbarkeit von Fe, Al und Mn wodurch die Metalle häufig toxisch wirken. Daneben wird die Verfügbarkeit von Phosphor verringert und die Aufnahme dadurch erschwert [216, 223]. Diese Effekte in Kombination führen jährlich zu Verlusten in der Landwirtschaft, da 20 % des Mais und 13 % des Reis auf sauren Böden angebaut wird [223]. Diese Zahlen zeigen einen der Gründe, aus welchen Al-Toleranz und Phosphateffizienz Gegenstand von Forschung sind. Die Toleranz von Mwg-3 gegenüber Faktoren des *acid soil syndrome* wurde aus diesem Grund phänotypisiert und mit den Ökotypen Col-0 und Ler-0 verglichen. Es sollten Eigenschaften, welche eine Adaptation an den sauren Boden theoretisch möglich machen identifiziert und molekular aufgeklärt werden.

Lokale Adaptation, die Anpassung an Umweltbedingungen vorherrschend im natürlichen Habitat, zur Steigerung der Fitness der Population, konnte bisher selten molekular aufgeklärt werden. Der Nachweis, oder auch nur experimentelle Hinweise auf eine lokale Adaptation zu detektieren, ist das große Ziel der Analyse von natürlicher Diversität. Viele Arbeiten beschäftigen sich mit dem Thema. Die Diversität die zwischen Ökotypen beobachtet wird, kann durch *genome-wide association studies* (GWAS) analysiert werden. Ein der ersten Arbeiten dazu identifizierte *A. thaliana* Ökotypen, welche sich in einem phänotypischen Merkmal (späte Blüte) ähnelten, als genetisch enge Verwandte und demonstrierte, dass das *linkage disequilibrium* (LD) für ein Feinmapping der chromosomalen Region geeignet war [224]. Durch eine GWAS in einem „*common garden experiment*“ (157 *A. thaliana* Ökotypen

von Europa wurden an 4 Standorten, welche deren geographische Ausbreitung abdecken, parallel kultiviert) konnten 2011 von Fournier-Level *et al.* 12 Kandidatengene identifiziert werden, für die nahe gelegene SNPs mit einer erhöhten Fitness (gemessen als Überlebensrate und Samenproduktion) korrelierten [132]. Nach dieser Untersuchung ist beispielsweise eine Variation in AT1G18140 (*LAC1*) entscheidend für die Samenbildung in deutschen *A. thaliana* Ökotypen. Hier wurde ein Einfluss der Temperatursaisonalität ermittelt. In wiefern *LAC1* zur lokalen Adaptation beiträgt, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Die Untersuchung von Fournier-Level *et al.*, welche in der Zeitschrift Science publiziert wurde, zeigte ein großes Ausmaß an lokaler klimatischer Adaptation der *A. thaliana* Ökotypen, für die durch GWAS Kandidatengene identifiziert werden könnten.

Für den Salzgehalt des Bodens, ein weiterer abiotischer Faktor welcher das Wachstum von Pflanzen beeinflusst, gelang die Aufklärung einer lokalen Adaptation [129]. Allelische Varianten des *HKT1* Locus konnten mit der geographischen Verteilung der jeweiligen Ökotypen in Verbindung gebracht werden. Es wurde gezeigt, dass ein SNP im *Hkt1* Gen mit einer Reduktion der Expression und damit einer geringeren  $\text{Na}^+$ -Entladung des Xylems in der Wurzel assoziiert ist. Dies führt zu einem erhöhten  $\text{Na}^+$ -Transport in den Spross. Ökotypen welche einer Salzquelle geographisch näher sind (Küsten sowie innerländliche Salzquellen) enthalten die hypofunktionale Variante des *Hkt1* Gens, was zur gesteigert Fitness führt [127, 129].

Für Mwg-3 wurde die Adaptation an den sauren Boden analysiert. Dabei wurde das Wachstum unter Phosphatmangel untersucht, wobei sich keine Unterschiede in der Wurzellänge von Col-0, Ler-0 und Mwg-3 zeigten. Die Protonentoleranz wurde anhand verschiedener Parameter erfasst. Dazu zählte sowohl die Wurzellänge, als auch Zellschädigungen nach kurzfristiger oder längerfristiger Behandlung von Keimlingen mit einem  $\text{H}^+$ -Überschuss. Unterschiede zu Col-0 oder Ler-0 ließen sich nicht feststellen. Ebenso wurde die Al-Toleranz erfasst, für die kein Unterschied zwischen den drei Ökotypen festgestellt werden konnte. Schließlich zeigte sich Mwg-3 Mn-tolerant. Unter Behandlung mit 700  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  wies Mwg-3 mit 40 % fast das doppelte rel. Wurzelwachstum im Vergleich zu Ler-0 und Col-0 auf. Unterschiede in der Mn-Toleranz konnten bisher auf Transporter wie *CAX2* zurückgeführt werden. Für diesen, in dem Tonoplast lokalisierten Transporter, wurde eine Transportaktivität für Mn, Cd und Ca in Tabak und eine verbesserte

Toleranz bei Expression in Hefen festgestellt [76]. Wu *et al.* charakterisierten 2002 einen weiteren Mn-Toleranz relevanten Transporter. ECA1 ist eine von 4 Mitgliedern der ER-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasen, welche  $\text{Ca}^{2+}$  transportiert [225]. Es konnte gezeigt werden, dass ECA1 die Mn-Toleranz von Mn-sensitiven Hefen verbessert. Zudem führt eine Mutation im Gen in *Arabidopsis* zur Hypersensitivität gegenüber Mn, erfassbar in einer Reduktion des Frischgewichtes und des Chlorophyllgehaltes, und die Mutanten waren weniger tolerant gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel [226]. Somit wiesen Wu *et al.* eine Rolle von ECA1 in der Ca, und Mn-Homöostase nach. Diese Beispiele zeigen nur zwei Faktoren, über die die Mn-Toleranz in *Arabidopsis* gesteuert wird. Um zu analysieren, ob eines dieser Proteine die Toleranz von Mwg-3 gegenüber Mn vermittelt, war die Sequenzierung der Gene in Mwg-3 erforderlich.

Statt nur einige Kandidatengene zu analysieren wurde der Ökotyp komplett sequenziert. Dabei konnten etwa 0.5 Mio. SNPs zu Col-0 detektiert werden, was in etwa der Anzahl an SNPs entspricht, welche für Ökotypen wie Bur-0 oder Tsu-1 detektiert wurden [19]. Ein Alignment mit allen anderen bereits sequenzierten Ökotypen des *1001 genomes* Projekt zeigte die größten Sequenzähnlichkeiten von Mwg-3 zu einem erst 2013 sequenzierten schwedischen Ökotyp: Hovdala-2 [227]. Dass es sich bei den ca. 1600 SNPs die Mwg-3 und Hovdala-2 unterscheiden nicht um Artefakte der Sequenzierung handelt, wurde durch unabhängige Markeranalysen nach Cosson *et al.* 2014 [228] und klassische Sequenzierungen bestätigt. Zudem konnte bei paralleler Anzucht der Ökotypen ein deutlich unterschiedlicher Phänotyp zwischen Mwg-3 und Hovdala-2 festgestellt werden. Hovdala-2 erwies sich aber als ebenso Mn-tolerant. Dass es sich bei dieser Eigenschaft tatsächlich um eine erhöhte Toleranz handelt, wird durch Analyse des Ökotyps Hex-0 ersichtlich. Dieser unterscheidet sich in seiner Mn-Toleranz nicht von Col-0 und Ler-0 und ist damit ebenfalls deutlich sensibler als Mwg-3 und Hovdala-2. Demnach sind die Referenzökotypen Col-0 und Ler-0 nicht besonders Mn-sensitiv. Die Ähnlichkeit in der Mn-Toleranz von Mwg-3 und Hovdala-2 ist interessant. In beiden Ökotypen könnte der gleiche Locus für die erhöhte Mn-Toleranz verantwortlich sein. Da sich die beiden in nur wenigen SNPs unterscheiden, ist es wahrscheinlich dass keine Sequenzunterschiede in den für den Mn-Toleranzphänotyp verantwortlichen Genen zu finden sind. Somit wäre die Ähnlichkeit der Mn-Toleranz von Mwg-3 und Hovdala-2 in ihrer engen Verwandtschaft begründet. Auch die beiden am nächsten mit Hovdala-2 und Mwg-3 verwandten Ökotypen, Puk2 und Kal2, stammen aus

Schweden. Somit könnte Mwg-3 ein aus Schweden stammender, und vor einigen Jahr(zehnt)en nach Deutschland eingeführter Ökotyp sein. Die Mn-Toleranz wäre in diesem Fall bereits vor der Trennung der Harzpopulation vom Ökotyp Hovdala-2 entwickelt worden.

Bei der Analyse der Metallgehalte (Daten A. Trampczynska, unveröffentlicht) viel für Mwg-3 vor allem ein extrem hoher Mo-Gehalt in den Samen auf. Daneben war auch der Mo-Gehalt in älteren Blättern erhöht. Baxter *et al.* konnten 2008 durch die Analyse der Variation im Spross-Mo-Gehalt von 98 *A. thaliana* Ökotypen zeigen, dass ein großer Unterschied im Mo-Gehalt zwischen den Ökotypen Ler-0 und Col-0 (20fach mehr) besteht. Dieser Unterschied wurde durch eine BSA in einer F2 einer Col-0 X Ler-0 Kreuzung auf den *Mot1* Locus zurückgeführt [198]. Eine *mot1*-Mutante zeigte einen Mo-Gehalt welcher dem von Ler-0 entsprach. Damit war impliziert, dass MOT1 für die Mo-Aufnahme und Verteilung Relevanz hat. In Ler-0 und anderen Ökotypen mit geringem Mo-Gehalt wurde dieser durch die Deletion der TATA Box in der Promotorregion von *Mot1* verursacht. 2011 wurde das *Mot1* Homologe *Mot2* auf seinen Effekt auf den Mo-Haushalt hin untersucht. Dabei wurde geschlussfolgert, dass MOT2 vor allem für die Samenbeladung relevant zu sein scheint [229]. Eine Untersuchung dieser Transporter in Mwg-3 wäre lohnenswert. Da bisher nur eine Variation im Mo-Gehalt von <0.5 in Ler-0 bis 3.5 µg/g<sub>Tg</sub> in Col-0 beobachtet wurde [198], kann durch Mwg-3 mit einem Mo-Gehalte von bis zu 12 µg/g<sub>Tg</sub> eine noch höhere natürliche Variation analysiert werden. Der große Unterschied könnte zusätzlich die Identifikation von Genen mit einem geringen Anteil an dem Gesamtphänotyp ermöglichen.

Neben Mo wurden auch für andere Metalle Unterschiede detektiert. In verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien zeigten sich in Mwg-3 abweichende Fe-Gehalte. Für Mn konnten in Mwg-3 nur in älteren, bräunlich Blättern höhere Gehalte detektiert werden. Ni-Gehalte unterschieden sich dagegen nur in seneszenten Blättern, in welchen sie 8fach höher waren. Auch Fe-Gehalte waren in seneszenten Blättern ca. 29fach erhöht. Dies könnte eine generell schlechte Remobilisierung von Ni und Fe in Mwg-3 implizieren. Für Schwermetalle konnte bisher keine Remobilisierung während der Alterung gezeigt werden, anders als für Makroelemente wie Stickstoff. Für dieses wurde eine Remobilisierung durch Seneszenz in Arabidopsis, Reis oder Mais nachgewiesen [230]. Ein systematischer Vergleich der Metallgehalte der Blätter während der Seneszenz könnte Unterschiede zwischen Mwg-3 und

anderen Ökotypen untermauern und könnte erste Hinweise auf eine Mikroelementremobilisierung geben.

Nachdem Unterschiede im Metallgehalt detektiert werden konnten, wurde auch die Toleranz von Mwg-3 gegenüber anderen Metallen mit der von Col-0 und Ler-0 verglichen (Daten A. Trampczynska, unveröffentlicht). Dabei zeigte Mwg-3 ein Ler-0 ähnliches Wachstum. Außer der Mn-Toleranz konnte nur eine schwach erhöhte Mo-Toleranz detektiert werden. Auch zeigte sich für Mwg-3 keine höhere Toleranz gegenüber hohen Fe-Konzentrationen oder eine bessere Effizienz unter Eisenmangelbedingungen. Die beobachtete Toleranz schien demnach Mn spezifisch zu sein und kein weiteres Metall zu betreffen.

Nach der Entwicklung eines besser geeigneten Systems zur Erfassung der Pb-Toleranz von *A. thaliana* Keimlingen (siehe Abschnitt 4: Phytochelatine vermitteln Bleitoleranz bei sub-mikromolaren Konzentrationen), wurde die Pb-Toleranz von Mwg-3 analysiert. Überraschenderweise zeigte Mwg-3 sich mit unter 10 % rel. Wurzelwachstum extrem sensitiv, während Col-0 unter gleichen Bedingungen rel. Wurzellängen von ca. 50 % aufwies [231]. Zu vermuten ist nun eine extrem geringe Verfügbarkeit des Pb, welches im natürlichen Habitat von Mwg-3 vorkommt. Da der Boden mit 40 % einen relativ hohen Organikanteil enthält, ist es möglich, dass die Pflanzen am Standort Pb nie aufgenommen haben. Pb interagiert mit organischen Bodenpartikeln [48] und ist in diesem Fall kaum bioverfügbar. Die tatsächliche Verfügbarkeit von Metallen im Boden zu bestimmen ist nur näherungsweise möglich. Durch verschiedene Extraktionsmethoden kann eine Annäherung an den durch Pflanzen extrahierbaren Anteil der Metalle im Boden erreicht werden. 2001 wurden von Bakircioglu *et al.* [232] die Konzentrationen der Metalle im Boden nach Extraktion mit 6 verschiedenen Methoden verglichen. Die Metallgehalte wurden mit den Gehalten der Metalle im Weizenkorn korreliert, um die Bioverfügbarkeit zu erfassen. Dabei konnten für die verschiedenen Metalle mit unterschiedlichen Methoden gute Korrelationen erreicht werden. So wurde z. B. für die Bleigehalte eine Korrelation von 0.8 durch die Extraktion mit HCl, EDTA oder DTPA berechnet. Es ist jedoch zu erwarten, dass die Messung der Pb-Gehalte anderer Pflanzenspezies in derselben Erde zu anderen Korrelationen führen wird. Grund dafür ist die Änderung der Metallverfügbarkeit in der Rhizosphäre durch die Pflanze. Beispielsweise ist bekannt, dass Pflanzen ihre Umgebung durch den Export von organischen

Anionen wie Citrat und Malat ansäuern und dadurch deren Verfügbarkeit beeinflussen [233]. Dabei gibt es große Unterschiede in der Effluxkapazität. So transportiert Weizen Malat mit einer Rate von 4000 nmol/g<sub>fg</sub>/h aus den Wurzelzellen in die umgebende Rhizosphäre, *Arabidopsis thaliana* exportiert Citrat, jedoch nur mit einer Rate von 122 nmol/g<sub>fg</sub>/h. Unterschiede im Einfluss, den die Pflanzen auf die Rhizosphäre nehmen, führen zu Unterschieden in der Bioverfügbarkeit von Schwermetallen die sich durch Extraktion der Metalle aus der Erde nicht erfassen lassen.

Die hohe Pb-Sensitivität macht den Ökotyp jedoch interessant für eine Analyse der Pb-Toleranzmechanismen. Der extreme Phänotyp, sollte eine Aufklärung der verantwortlichen Loci durch eine QTL Analyse der inzwischen etablierten Mwg-3 X Col-0 RIL Population oder durch BSA möglich machen.

Mwg-3 scheint speziell für Mn eine deutlich erhöhte Toleranz zu besitzen. Zudem prägt Mwg-3 unter Mn-Mangel möglicherweise Defizienzsymptome aus. Dies wurde aus mikroskopischen Analysen der Veränderung der Wurzelhaarbildung nach Metallbehandlung geschlossen (Daten A. Trampczynska unveröffentlicht). Eine vermehrte Wurzelhaarbildung unter Mn-Defizienz wurde von Yang *et al.* 2008 dokumentiert, quantifiziert und mit geringeren Mn-Gehalten in Spross und Wurzel in Zusammenhang gebracht [234]. Das Wurzelhaare in der Metallaufnahme beteiligt sind, wurde u.a. aus den Untersuchungen von Tanaka *et al.* geschlossen. Hier wurde gezeigt, dass die transgene *A. thaliana* Linie „No root hair line“ NR23 weniger B und Zn und dagegen mehr Cu aufnimmt [235]. Gleichzeitig wurde eine schlechte Toleranz gegenüber Fe oder Zn-Mangelbedingungen sichtbar, da die Wurzellänge und das Frischgewicht der Mutanten unter diesen Bedingungen reduziert waren. Die Mn-Toleranz von Mwg-3 könnte, neben einer besseren Detoxifikation der Ionen nach deren Aufnahme, also auch mit einer geringeren Aufnahme von Mn in Verbindung stehen. Auf dem sauren, Mn-reichen Boden benötigt Mwg-3 kein effizientes Transportsystem für die Ionen. Eine anfänglich geringere Aufnahme als in Col-0 könnte eine Akklimatisation an den Mn-Stress ermöglichen, die in Col-0 nicht erfolgen kann, da die Konzentration durch eine höhere Transportrate zu schnell ein zellschädigendes Niveau erreicht. Ein Vergleich der Mn-Gehalte in Col-0 und Mwg-3 Keimlingen unter Mn-Stress sowie Kontrollbedingungen bei welchen den Keimlingen kein zusätzliches Mn zur Verfügung gestellt wird, könnte Aufschluss darüber geben, ob dieser Mechanismus zur Toleranz von Mwg-3 beiträgt.

Für eine Identifikation des Mechanismus welcher der Mn-Toleranz zugrunde liegt, wurde zunächst der Phänotyp in der F1 erfasst. In dieser Population sind alle Individuen an jeder Position ihres Genoms heterozygot. Es zeigte sich, dass die F1 ein Mwg-3 ähnliches Wachstum aufwies. Dies legte nahe, dass zumindest einer der phänotyprelevanten Loci aus Mwg-3 einen dominanten Effekt hatte. Da für Pflanzen der Heterosis Effekt bekannt ist, muss jedoch durch eine Untersuchung des Wachstums einer F1 unter Kontrollbedingungen ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Mn-Toleranz nicht auf ein grundsätzlich verbessertes Wachstum zurückzuführen ist. Bei dem Heterosis Effekt handelt es sich um das Phänomen, dass aus einer Kreuzung zweier genetisch diverser Inzuchtlinien eine F1 Generation mit höheren Biomassen, schnellerer Entwicklung und höherer Fertilität entstehen kann. Grund dafür scheint, wenn dies molekular auch noch nicht vollständig verstanden ist, eine höhere genetische Diversität zu sein. Diese erlaubt es den F1 Individuen Eigenschaften beider Eltern zur besseren Fitness zu kombinieren [236]. Um festzustellen, ob es sich bei dem beobachteten Phänotyp tatsächlich um den Einfluss dominanter Mwg-3 Loci handelt, wurde die F2 untersucht. Laut Mendel spaltet in der F2 der Phänotyp unter den Individuen auf. In einem klassischen Erbgang mit einem dominanten/rezessiven Locus ist das Aufspaltungsverhältnis 3:1 d. h. auf 3 tolerante Individuen käme 1 Intolerantes. Ist das verantwortliche Gen intermediär, so würde der Phänotyp, wie auch der Genotyp in ein 1:2:1 Verhältnis aufspalten, d. h. ein tolerantes homozygotes Individuum mit Genen aus dem toleranten Elternteil, zwei intermediäre heterozygote Individuen und ein intolerantes, Homozygotes mit Gene aus dem intoleranten Elternteil. Sind dagegen zwei Loci an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt ändern sich die Verhältnisse zu 9:6:1 für einen dominant/rezessiven und zu 1:4:6:4:1 für einen intermediären Erbgang. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass beide Loci zu gleichen Teilen zum Phänotyp beitragen. In keinem Fall berücksichtigen diese Verteilungen der Phänotypen Rekombinationsereignisse wie sie bei der Bildung der Gameten in der F1 stattfinden. Zudem wird die Situation mit jedem weiteren Locus der an der Ausbildung des Phänotyps beteiligt ist komplizierter, da sich mehr Kombinationsmöglichkeiten ergeben. Auch ein gleicher Einfluss der Loci auf den Phänotyp, entspricht selten der natürlichen Situation. Im vorliegenden Fall, beim Vergleich des Wachstums der F2 einer Col-0 X Mwg-3 Kreuzung wurde die Wachstumsverteilung unter 700  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , der Konzentration bei welcher der größte Unterschied zwischen Col-0 und Mwg-3 dokumentiert werden konnte, untersucht. Im Vergleich zur F1 wurden tendenziell



kürzere Wurzeln ausgebildet. Es wurde ein Verhältnis von Mn-sensitiven zu intermediär wachsenden zu Mn-toleranten Individuen beobachtet, was auf einen intermediären Locus schließen lässt. Die leichte Verschiebung zu längeren Wurzeln könnte ein Indiz dafür sein, dass einer der Mn-Toleranz Loci aus Mwg-3 dominant ist. Eventuell hat dieser nur einen geringen Anteil an der Ausbildung des Phänotyps, weshalb der Effekt in der F2 nicht größer ist. Um diese Beobachtungen zu bestätigen werden zunächst noch weitere F2 Individuen phänotypisiert werden. Vermutlich ist die genetische Situation jedoch komplexer, umfasst mehrere Loci mit variablem Effekt auf den Phänotyp und kann mit den mendelschen Gesetzen nicht beschrieben werden.

Um die genetische Situation in Mwg-3 aufzuklären und chromosomale Bereiche mit Kandidatengenen für die höhere Mn-Toleranz zu identifizieren, wurden zwei Mapping Strategien verfolgt. Zum einen sollten die Regionen mit phänotypverantwortlichen Genen in einer „*Bulk Segregant Analysis*“ (BSA) identifiziert werden, zum anderen sollten sie durch eine Sequenzierung detektiert werden. Beiden Methoden liegt die Generierung zweier Pools an F2 Individuen einer Kreuzung aus Mwg-3 und Col-0 zugrunde. Es wurden 2 Pools in der F2 selektiert. Einer bestand aus toleranten Individuen und einer aus intoleranten Individuen. In diesen beiden Pools werden Mwg-3 bzw. Col-0 charakteristische SNPs in bestimmten Genomabschnitten angereichert. Dagegen sind SNPs statistisch gesehen gleichmäßig zwischen den Pools verteilt, sofern sie nicht toleranzrelevant sind (d. h. die nicht in der Nähe eines Gens liegen, welches für die Toleranz in Mwg-3 entscheidend ist). Detektiert man die SNPs beider Pools und vergleicht die Verteilung der Mwg-3 zu Col-0 SNPs mit der genomischen Position, so ergibt sich eine Region, die im toleranten Pool mehr oder auch ausschließlich Mwg-3 SNPs enthält während im intoleranten Pool der Col-0 Genotyp zu finden ist.

Die SNP Detektion mit Hilfe einer BSA wurde 2003 von Borevitz *et al.* beschrieben. Dabei wurde mit Hilfe zweier Pools aus je 15 Individuen einer Col-0 X Ler-0 Kreuzung die Position des bereits Bekannten ERECTA Locus bestimmt. Das Maximum „*log likelihood ratio*“ (LLR), welches in diesem Fall aus den Unterschieden in der Anreicherung der Col-0 und Ler-0 SNP zwischen den Pools berechnet wurde, lag bei 53 cM und damit nur 3 cM von der tatsächlichen Position des ERECTA Locus entfernt [221]. Hazan *et al.* demonstrierten 2005 an

6 weiteren Beispielen die Genauigkeit der Methode. Dabei wurden die Mutationen in einem Intervall von maximal 2 Mb um die SNP Verteilungsunterschiede, welche mittels BSA bestimmt wurden, identifiziert [237]. Voraussetzung für die Identifikation eines verantwortlichen Sequenzunterschiedes, durch Hybridisierung der gDNA zweier phänotypisch unterschiedlicher Pools mit einem ATH1 Array, ist jedoch ein ausreichend großer Effekt von wenigen Loci. Sind zu viele Gene an unterschiedlichen Positionen an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt, wird die Detektion von Hybridisierungsunterschieden schwierig. Dadurch unterscheiden sich Signale in den phänotypisch relevanten Regionen weniger stark voneinander und es kann kein deutlicher Unterschied zu den phänotypisch irrelevante Regionen detektiert werden. Bei der Hybridisierung der DNA-Pools der, aufgrund der Mn-Toleranz selektierten F2 Individuen der Col-0 X Mwg-3 Kreuzung, konnten bisher keine Regionen in Genom identifiziert werden, welche sich deutlich in ihrem Hybridisierungssignal unterschieden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte die nötige Selektion einzelner, diagnostisch relevanter Abschnitte im Genom noch nicht erfolgen. Dafür wird zusätzlich die Hybridisierung von Mwg-3 auf eine AtH1 Chip notwendig sein. Dadurch werden SNPs detektiert werden können, welche diagnostisch relevante Regionen markieren. In diesen wird ein Signalunterschied in den Pools eine Aussage über die jeweiligen Allele (Mwg-3 oder Col-0) in den Pools zulassen.

Durch die Sequenzierung des Mwg-3 Genoms wurden auch Informationen über die Sequenz von in der Metallhomöostase relevanten Genen gewonnen. Diese sind, aufgrund ihrer bereits beschriebenen Funktion, Kandidatengene für eine Erklärung des Unterschiedes in der Mn-Toleranz. Aus einer aktuellen, 243 „Metallgene“ umfassenden Liste (pers. Kommunikation Singh *et al.*), konnten allein mehr als 100 Gene identifiziert werden, deren Sequenzen in Mwg-3 Insertionen oder Deletionen (Indels) aufweisen Für diese Gene ist eine in Mwg-3 unterschiedliche Proteinfunktion gut möglich. Dazu kommen diejenigen, welche einen nicht-tolertierte AS Austausch in Mwg-3 aufweisen. Die erforderliche Annotierung der SNP in den „Metallgenen“ und die anschließende SIFT Analyse erfolgt momentan. Eine Auswahl eines Kandidatengens wird zudem auf der Detektion einer genomischen Region durch die Datenanalyse der BSA beruhen. Nachdem hier eine Methode implementiert wurde mit welcher die Auswertung bereits publizierter Datensätze reproduzierbar ist, kann eine Detektion chromosomaler Regionen erfolgen. Im Anschluss werden offensichtliche

Kandidatengene aus der Region diejenigen „Metallgene“ sein, für die ein Sequenzunterschied zwischen Mwg-3 und Col-0 detektiert werden konnte.

Die SNP Detektion durch eine Sequenzierung der beiden DNA Pools, mit der NGS Technologie, stellte die zweite Methode dar über die die Mn-Toleranz genetisch aufgeklärt werden sollte. Eine solche Sequenzierung detektiert neben kleineren Sequenzveränderungen auch Genduplikationen [19, 158]. Schneeberger *et al.* demonstrierten 2009 die Verwendung der kompletten Genomsequenzierung einer F2 Population, welche aufgrund des mutanten Phänotyps der EMS-mutagenisierten Elternlinie (langsames Wachstum und hellgrüne Blätter) selektiert wurde. Detektiert wurde dadurch die Lokalisation der Mutation im Gen *Cat2*, welches für eine Catalase mit zirkadianer Regulation codiert [24]. Dessen T-DNA Insertionsmutante zeigte in einer früheren Untersuchung ebenfalls den selektierten Phänotyp. Sie wächst mit einer reduzierten Geschwindigkeit und weist unter stärkerer Belichtung Blattnekrosen auf [238]. Schneeberger *et al.* demonstrierten damit, dass Sequenzinformationen über eine F2 Population genutzt werden können um einen Phänotyp zu mappen. Im Unterschied zu GWAS, bei welchen Sequenzinformationen über viele Ökotypen kombiniert werden, kann hier eine einzige Sequenzierung ausreichend sein um eine Mutation zu lokalisieren. Dafür ist eine Selektion von vielen Individuen die einen gemeinsamen Phänotyp aufweisen die Voraussetzung. Schneeberger *et al.* notierten dabei, dass ihre Methode auch für die Detektion von QTL Regionen geeignet ist, dass der Erfolg jedoch auch hier von den der Stärke des Einflusses der jeweiligen Region auf den Phänotyp abhängt. Die Anwendung dieser Mappingmethode, genannt SHOREmap [19], für die Detektion von bis dahin unbekannten SNPs in EMS mutagenisierten Pflanzen wurde 2012 von Hartwig *et al.* dokumentiert [239]. Das SHOREmap identifizierte 3 Nukleotidaustausche in 3 Genen, welche mit dem untersuchten mutanten Phänotyp segregierten. Eine Resequenzierung der drei Gene in den F2 Pools identifizierte eine Mutation, welche mit dem Phänotyp segregierte. Damit konnte das Gen verantwortlich für den beobachteten Phänotyp identifiziert werden.

Aus der Analyse der Sequenz der Mn-toleranten und Mn-intoleranten Pools ergab sich jedoch kein eindeutiger *Peak*. Es wurde eine hohe Anzahl an SNPs detektiert, welche weder Mwg-3 noch Col-0 zugeordnet werden konnte. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die F2 Samen aus welchen die beiden Pools selektiert wurden, mit einem weiteren Ökotyp

verunreinigt waren. SNPs des dritten Ökotyps wurden somit ebenfalls in einem der beiden Pools angereichert und verfälschen nun das Ergebnis. Es war damit nicht möglich eine Kandidatengene erhaltende Region einzugrenzen. Eine neue Kreuzung von Mwg-3 mit Col-0 und eine anschließende Generierung der F2 Pools wird eine Detektion der chromosomalen Region durch eine Sequenzierung möglich machen.

Die, in früheren Analysen beobachtete, Mn-Toleranz von Mwg-3 konnte bestätigt werden. Zudem wurde klar, dass Mwg-3 nicht toleranter gegenüber anderen Faktoren des *acid soil syndromes* ist als der Referenzökotyp Col-0. Im Folgenden wird die Mn-Toleranz weiter genetisch aufgeklärt, indem bioinformatische Methoden für die BSA Auswertung an den hier vorliegenden Datensatz angepasst werden und möglicherweise, indem eine weitere Sequenzierung von neu generierten F2 Pools erfolgt. Durch die Detektion einer Region, können enthaltene „Metallgene“ mit Sequenzunterschieden zwischen Mwg-3 und Col-0 identifiziert werden. Kann der Effekt eines Kandidatengens aus Mwg-3 auf die Mn-Toleranz bestätigt werden, könnte eine Adaptation an den Mn-haltigen, sauren Standort aufgrund einer veränderten Funktion des isolierten Gens untersucht werden. Zu diesem Zweck würden natürlich vorkommende Ökotypen auf ähnliche funktionale Veränderungen im Kandidatengen auf ihre Mn-Toleranz hin untersucht werden. Eine positive Korrelation einer hohen Mn-Toleranz von Ökotypen mit einem Mwg-3 ähnlichem Kandidatengen und einem Vorkommen dieser Ökotypen auf Böden mit hoher Mn-Verfügbarkeit, würde eine Adaptation nahe legen. Es besteht die Möglichkeit eines Zusammenhangs der Toleranz mit der Transkriptmenge des Kandidatengens, wie es für HKT1 gezeigt wurde [129]. Eine weitere Möglichkeit ist die Korrelation von Mutationen in essenziellen und hoch konservierten AS, welche die Funktion des Proteins maßgeblich beeinflussen, mit der Mn-Toleranz. Dieser Mechanismus wurde für den HMA3 Transporter gezeigt, bei welchem 10 Haplotypen identifiziert werden konnten von welchen 5 funktionale Proteine codieren und zu einem niedrigerem Cd-Gehalt im Spross führen [93]. Auch in diesem Fall wurden mögliche Mechanismen einer Adaptation an den Gehalt an bioverfügbarem Cd im Boden, sichtbar am *HMA3* Locus, diskutiert. Gelingt es einen solchen Zusammenhang für ein Mwg-3 Kandidatengen zu zeigen und zudem allelische Varianten mit der Metallbioverfügbarkeit zu korrelieren, wäre dies der erste Nachweis einer Adaptation an Metallverfügbarkeiten.

## **Teil 4**

### **Phytochelatine vermitteln Bleitoleranz bei sub- mikromolaren Konzentrationen**

### **1. Einleitung**

Schon seit der Benennung der Phytochelatine (PCs) und deren Relevanz für die pflanzliche Schwermetallkomplexierung 1985 [79] wird vermutet, dass Blei eines der toxischen Schwermetalle ist, welches durch PCs detoxifiziert wird [84]. Ein direkter Nachweis der Relevanz von PCs für die Bleitoleranz, zum Beispiel durch Analyse einer PC defizienten Mutante, konnte jedoch bis heute nicht erbracht werden. Grund dafür sind experimentelle Schwierigkeiten, die sich aus den Eigenschaften von Blei, seiner geringen Löslichkeit bei dem standardmäßig verwendeten pH von 5.7, sowie seiner Tendenz mit Phosphaten zu präzipitieren, ergeben. Schon früh wurde deshalb ein Wachstumssystem speziell für die Analyse von Bleitoleranzen gefordert [44, 240]. Tatsächlich verwenden die meisten Studien stattdessen Konzentrationen im millimolaren Bereich und allgemein gebräuchliche Wachstumsmedien. Kopittke *et al.* analysierten 2010 in einer Metastudie die Toxizität von Blei. Dabei konnten von 1975 an bis Juli 2009 nur 3 Studien ausgewählt werden, die Blei-Toxizität unter von Kopittke *et al.* als experimentell akzeptable eingestuften Bedingungen analysierten. Unter diesen realistischen Bedingungen ergab sich für Pb die höchste Toxizität, verglichen mit allen anderen betrachteten Schwermetallen. Vergleichbar giftig war nur Quecksilber. Beide verursachten bei unter 1  $\mu\text{M}$  Vergiftungssymptome [45]. Kopittke fasste zusammen, dass sich zukünftige Studien bei der Analyse von Blei an drei Richtlinien orientieren sollten, um verwertbare Aussagen über die toxischen Effekte von Blei zu produzieren. Es sollte 1) ein Wachstumsmedium verwendet werden, welches in seiner Zusammensetzung idealerweise einer Bodenlösung entspricht, besonders im Bezug auf die Phosphatkonzentration. 2) Der pH sollte während des Versuches gemessen und über die Entwicklung sollte berichtet werden, und 3) die lösliche Pb-Konzentration nach Zugabe zu dem Wachstumsmedium sollte vermessen und angegeben werden [45].

Dass die Erforschung der Bleiaufnahme und -verteilung relevant für die globale gesundheitliche Entwicklung ist, zeigt unter anderem eine Studie der WHO, die negative Effekte von Blei auf die menschliche Entwicklung abschätzt [241]. Aufgrund der langen Halbwertszeit im menschlichen Körper sind besonders ältere Menschen von den kumulativen Effekten einer jahrelangen Bleikontamination betroffen. Blei steht aus diesem

Grund auf dem zweiten Platz der Liste von gefährlichen Substanzen des *Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act* (CERCLA).

Die chronische Belastung mit geringen Konzentrationen führt zu Schädigungen welche am stärksten das zentrale Nervensystem, die Vaskulatur sowie die Nieren betreffen. Der Hauptweg der nicht-arbeitsbedingten Bleikontamination ist die Aufnahme bleihaltiger Nahrungsmittel [49]. Die Bleikonzentrationen in essbaren Nahrungsmitteln liegen dabei im Mittel bei 0.025 mg / kg (0.017 mg / kg in Wurzeln und Knollen, 0.037 mg / kg in Gemüsen und Kürbissen). 65 bis 93 % der wöchentlichen Pb Aufnahme von 2–4 µg / kg Körpergewichtes stammt demnach von essbaren Pflanzenorganen [241]. Eine Verringerung dieser nahrungsbedingten Bleikontamination sollte das Ziel in der Nahrungsmittelproduktion sein. Dafür nötig sind Informationen über molekulare Mechanismen der Bleiaufnahme und -detoxifikation in Pflanzen.

Es war deshalb hier das Ziel ein System zur vergleichbaren Erfassung der Bleitoleranz unter kontrollierten Bedingungen und unter Verwendung realistischer Konzentrationen zu entwickeln. In diesem System sollte anschließend der Beitrag der Phytochelatine an der Pb-Toleranz in Pflanzen erfasst werden.

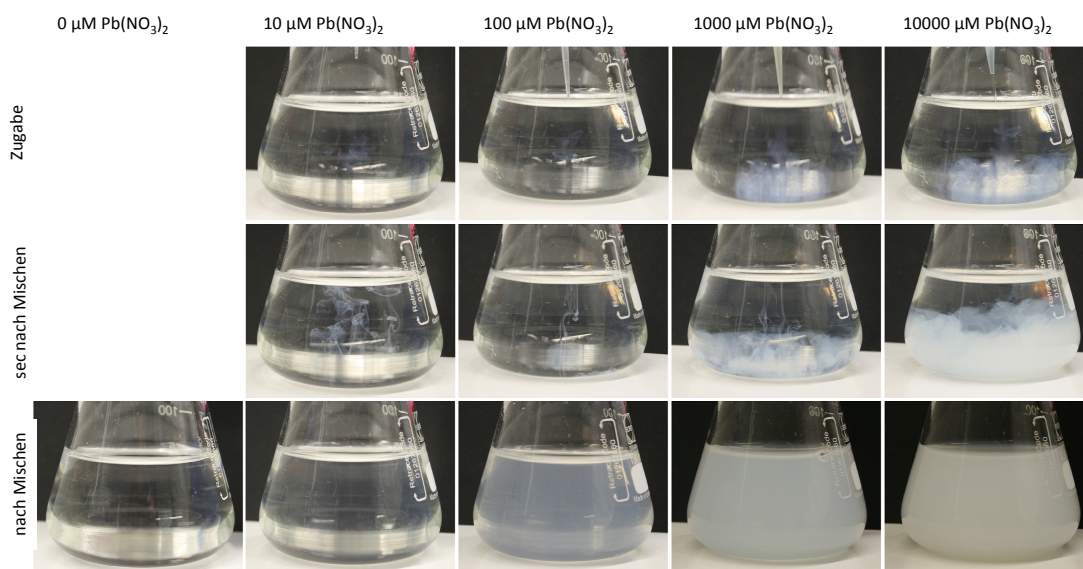
## 2. Ergebnisse

*AtPCS1* ist eines der zwei Gene von *Arabidopsis thaliana*, welche eine Phytochelatinsynthase (PCS) codieren. Es steuert dabei den größten Teil zur PCS-Proteinmenge bei. Sein Anteil am Überleben eines Cd-, As- und Zn-Überschusses ist gut dokumentiert [81, 82]. Eine Rolle bei der Pb-Detoxifikation wurde für *AtPCS1* vermutet, jedoch fehlen direkte Nachweise einer erhöhten Blei-Sensitivität von *AtPCS1* defekten Mutanten. Aus diesem Grund wurde das Wachstum von zwei *AtPCS1*-Mutanten *cad1-3* [80] und *cad1-6* [82], sowie des Wildtyps Col-0 in Gegenwart verschiedener Pb-Konzentrationen untersucht.

### 2.1. Pb Verfügbarkeit und Toxizität in Standardwachstumsmedien

Zunächst wurden die beiden standardmäßig verwendeten Medien 1/2 MS und 1/10 Hoagland verwendet, um die Bleitoxizität zu erfassen. Dies sollte die Probleme bisheriger Studien dokumentieren. In Übereinstimmung mit Kopittke *et al.* [45] wurden während des Versuches pH-Wert und verfügbare Bleikonzentration verfolgt.

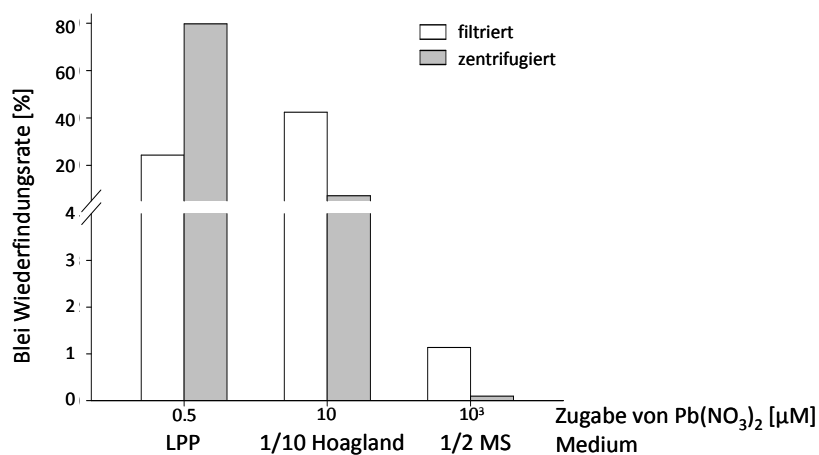
Zunächst fiel die Verfärbung des MS Mediums nach Zugabe des Bleinitrates auf (Abb. 53). Um diese Präzipitation zu dokumentieren wurden die Medien mittel ICP-OES vermessen.



**Abb. 53:** Verfärbung des 1/2 MS Mediums durch die Zugabe von  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Zunächst ist die Situation bei der Zugabe des Bleis zu sehen, Sekunden später verfärbt sich das Medium milchig weiß. Je mehr Blei zugegeben wurde, umso trüber ist die Lösung nach dem Mischen.



Dafür wurde zunächst eine Methode zur Trennung von löslichem Blei (sowie anderen löslichen Bestandteilen) und den Präzipitaten etabliert. Zwei Verfahren wurden miteinander verglichen. In dem einen wurde das mit Pb versetzte MS Medium gefiltert, in dem anderen für 30 min zentrifugiert. In Abb. 54 ist ein Vergleich der Wiederfindungsraten von Blei in Lösungen gewonnen durch Filtrierung und Zentrifugation zu sehen. Dabei wurde die Wiederfindungsrate ermittelt als die gemessene Konzentration im Verhältnis zur Konzentration von Blei, die durch Zugabe von jeweils 0,5, 10 oder 1000  $\mu\text{M}$  Bleinitrat zu erreichen sein sollte.



**Abb. 54:** Vergleich der Bleiwiederfindungsrate durch die Bestimmung der löslichen Blei Konzentration mittels ICP Analyse in verschiedenen Medien nach Filtration (grau) oder Zentrifugation (weiß).

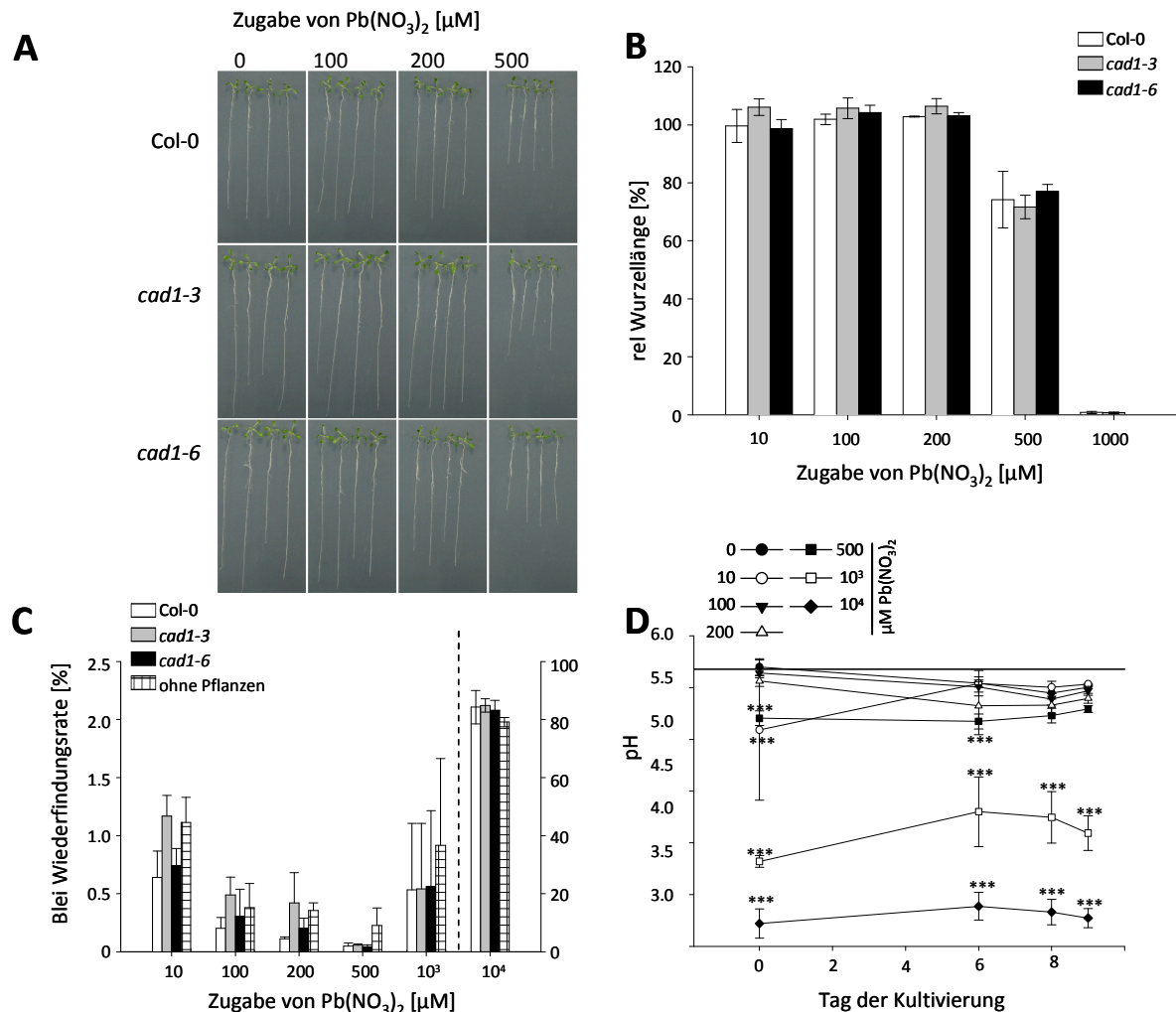
Im 1/2 MS und 1/10 Hoagland Medium wurden durch Filtration höhere Wiederfindungsraten erreicht als durch Zentrifugation. Neben den üblichen Wachstumsmedien wurde ein neu entwickeltes Medium auf seine Bleiwiederfindungsrate hin getestet. In diesem gering Phosphat/ gering pH (LPP) Medium waren nach Filtration ca. 20 % und nach Zentrifugation 80 % des Pb detektierbar. Dieser Vergleich zeigte zweierlei. Einmal schien die Filtration geringere Wiederfindungsraten im LPP Medium, bei geringen Bleikontaminationen zu produzieren, als die Zentrifugation. Dies lässt sich vermutlich auf die Beschaffenheit des verwendeten Zellulose Filters zurückführen. Auf diesem, aus organischem Material bestehenden Filter, präzipitierten noch zusätzliche Bleimoleküle, was die Wiederfindungsrate verfälschte und verringerte. Bei hohen Bleikonzentrationen, wie sie im MS und Hoagland Medium verwendet wurden, konnte dagegen nicht das gesamte Präzipitat vom Filter zurück gehalten werden. Zum Zweiten lag die Rate im neu entwickelten Medium, mit 80 % weit über der im Hoagland (3-9 %) oder MS Medium (0.7-1 %). Dazu mehr

bei der später beschriebenen Methodenentwicklung (2.2. Test eines neuen Wachstumsmediums zur Erfassung der Pb Toleranz unter umweltrelevanten Bedingungen). Aus diesem Grund wurde die Zentrifugation zur Analyse der Blei Wiederfindungsrate verwendet.

Für die Überprüfung der Toxizität von Blei in Hoagland und MS Medium wurden Versuche mit *Arabidopsis* Keimlingen im Flüssigsystem durchgeführt (Vgl. Mat. Meth. 2.4.4. Pflanzenanzucht in 6-well Platten). Die Wurzellängen wurden nach 9 Tagen Wachstum ausgewertet. Außerdem wurden pH-Wert und Bleiverfügbarkeit im Verlaufe des Versuches kontrolliert.

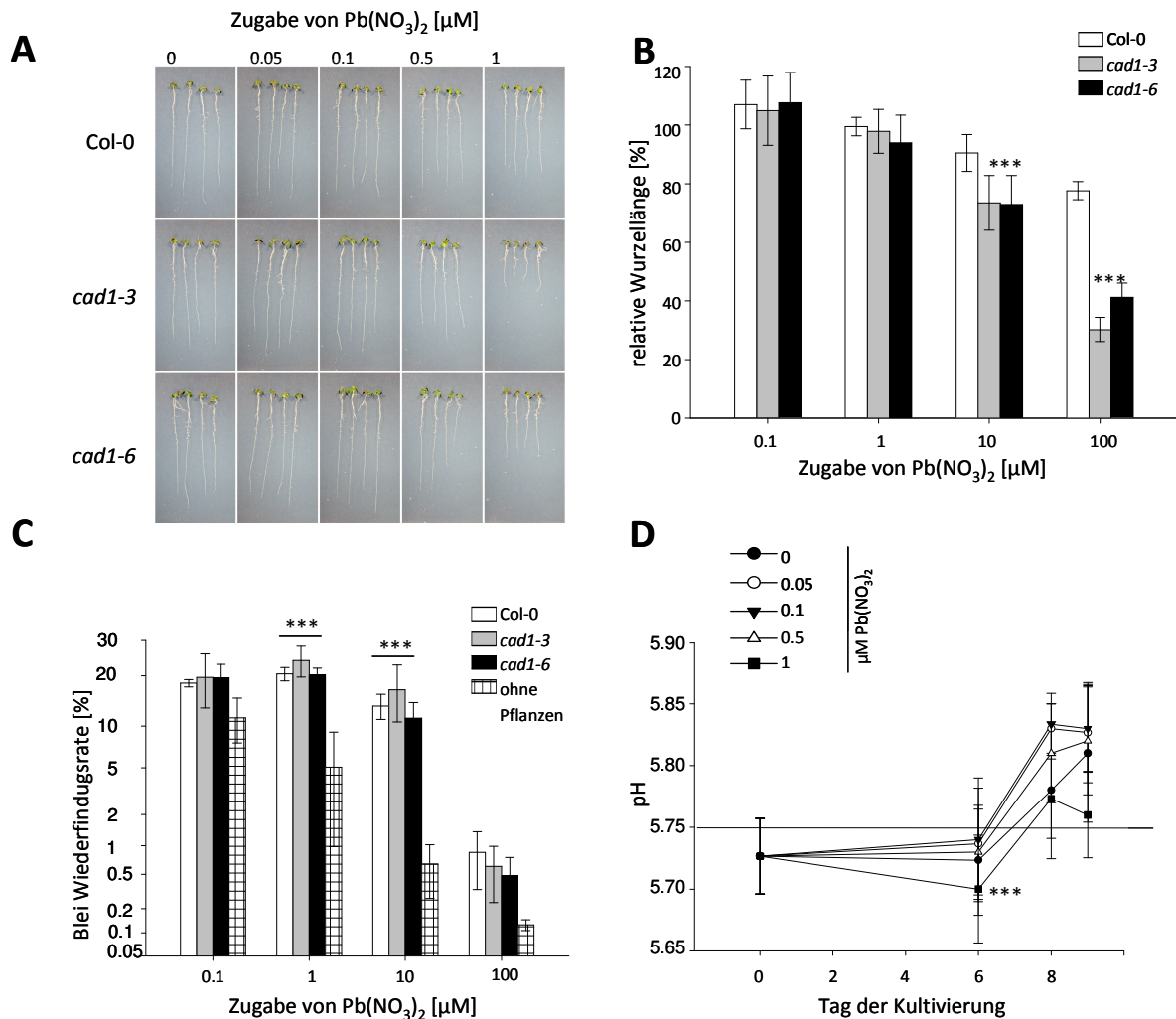
Im MS Medium war die Bleiwiederfindungsrate extrem gering (Abb. 55 C). Bei Konzentrationen zwischen 1 und 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  lag sie unter 1.5 %. Dabei war nicht entscheidend ob Keimlinge im Medium gewachsen waren oder nicht. Bei der höchsten Konzentration von 10 mM wurde 84 % Blei wieder gefunden. Diese drastische Erhöhung der Rate war wohl darauf zurück zu führen, dass alle im Medium gelösten Phosphate durch das Blei ausgefällt wurden, und die verbleibenden Blei-Ionen nun nicht mehr präzipitieren können. Auch beim pH sah man die größten Abweichungen vom Wert des Ausgangsmediums bei Zugabe von 10 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Durch die Präzipitation von  $\text{Pb}_3(\text{PO}_4)_2$  wurde die Pufferkapazität des Medium stark beeinflusst und der pH sank auf unter 3 (Abb. 55 D). Auch geringere Konzentrationen von  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  im Medium beeinflussten den pH konzentrationsabhängig. Beide Messungen zeigten, dass in MS Medium ein Stressen der Pflanzen mit Bleinitrat auch zu sekundären Veränderungen im Medium, wie der drastischen Verringerung des pH-Wertes und vermutlich des Phosphatangebotes, führte. Die relative Wurzellänge von *A. thaliana* war im MS Medium erst ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  beeinträchtigt (Abb. 55 A,B). Bei dieser Konzentration war 0.1 % des Bleis löslich. Dabei war kein Unterschied zwischen den drei Genotypen Col-0, *cad1-3* und *cad1-6* zu erkennen. Höhere Konzentrationen führten zum Tod der Pflanzen (Abb. 55 B), wobei jedoch eine Aussage über die Ursache aufgrund der sekundären Veränderungen des Mediums durch die Bleizugabe erschwert wurde.

Im MS Medium sind 624  $\mu\text{M}$  Phosphat enthalten, in einer Bodenlösung jedoch nur 5-45  $\mu\text{M}$  [50, 242]. Das 1/10 Hoagland Medium repräsentiert in diesem Punkt bereits eine Situation welche der natürlichen etwas näher kommt. Hier sind nur 100  $\mu\text{M}$  Phosphat enthalten.



**Abb. 55:** Toxizität von Blei im 1/2 MS Medium. **(A)** Col-0 (WT) und die *cad1*-Mutanten (*cad1-3* und *cad1-6*) wurden auf Agarplatten ausgelegt und fotografiert, nachdem sie für 9 Tage in einem Flüssigsystem, in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Blei, kultiviert wurden. **(B)** Die relative Wurzellänge (% des Wachstums unter Kontrollbedingungen) wurde für 2 unabhängige Experimente ermittelt ( $n = 16-45$  Keimlinge). Gezeigt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die mittlere Wurzellänge von Col-0 unter Kontrollbedingungen betrug  $62 \pm 6.9$  mm, die von *cad1-3*  $59 \pm 8$  mm und von *cad1-6*  $61 \pm 6.2$  mm. **(C)** Dargestellt ist die Wiederfindungsrate von Blei im Wachstumsmedium, bestimmt mittels ICP-OES Messungen der zentrifugierten Lösungen. Für Medien mit 10 – 1000  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ist die Rate an der linken Achse ablesbar. Für das Medium versetzt mit 10 mM ist die Wiederfindungsrate auf der rechten Achse abzulesen. MW  $\pm$  SD mit  $n = 3-6$ . **(D)** Der Verlauf des pH-Wertes während des Versuches und in Abwesenheit von Pflanzen wurde graphisch dargestellt (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die horizontale Linie repräsentiert den Ausgangs pH des Mediums vor Zugabe des  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

U. a. die verminderte Phosphatkonzentration führte dazu, dass bereits bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ein inhibitorischer Effekt auftrat (Abb. 56 A,B) wobei unter diesen Bedingungen 0.5 – 1 % des Bleis in gelöster, verfügbarer Form vorlagen (Abb. 56 C). Unter diesen Bedingungen war auch ein Wachstumsunterschied zwischen den *cad1*-Mutanten und deren Wildtyp Col-0 zu sehen. Ab einer Bleikonzentration von 10  $\mu\text{M}$  hatten beide eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte relative Wurzellänge (um 20 % bzw. 35 %).



**Abb. 56:** Toxizität von Blei im 1/10 Hoagland Medium. **(A)** Col-0 (WT) und die *cad1*-Mutanten (*cad1-3* und *cad1-6*) wurden auf Agarplatten ausgelegt und fotografiert, nachdem sie für 9 Tage in einem Flüssigsystem, in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Blei, kultiviert wurden. **(B)** Die relative Wurzellänge (% des Wachstums unter Kontrollbedingungen) wurde für 3 unabhängige Experimente ermittelt ( $n = 41\text{-}72$  Keimlinge). Gezeigt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die mittlere Wurzellänge von Col-0 unter Kontrollbedingungen betrug  $61.2 \pm 7.9$  mm, die von *cad1-3*  $61.5 \pm 5.5$  mm und von *cad1-6*  $64.2 \pm 8.1$  mm. **(C)** Dargestellt ist die Wiederfindungsrate von Blei im Wachstumsmedium, bestimmt mittels ICP-OES Messungen der zentrifugierten Lösungen. MW  $\pm$  SD mit  $n = 3$ . **(D)** Der Verlauf des pH-Wertes während des Versuches und in Abwesenheit von Pflanzen wurde graphisch dargestellt (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die horizontale Linie repräsentiert den Ausgangs pH von 5.7 vor Zugabe des  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels Zweiwege-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Trotz der verringerten Phosphatkonzentration blieb die Löslichkeit von Blei im 1/10 Hoagland Medium begrenzt. Bei einer Konzentration von nur 0.1 % Bleinitrat konnten, nach Analyse des Mediums ohne Pflanzenbewuchs nur 10 % des Bleis wieder gefunden werden. Bei der 10fach höheren Bleikonzentration reduzierte sich die Wiederfindungsrate auf 5 %. Dies verdeutlichte, dass noch immer konzentrationsabhängig Blei durch die Eigenschaften des Mediums ausgefällt wurde und eine wesentlich geringere effektive Bleikonzentration auf die Pflanzen wirkte. So war die toxische Bleikonzentration von 100  $\mu\text{M}$  noch immer zwei

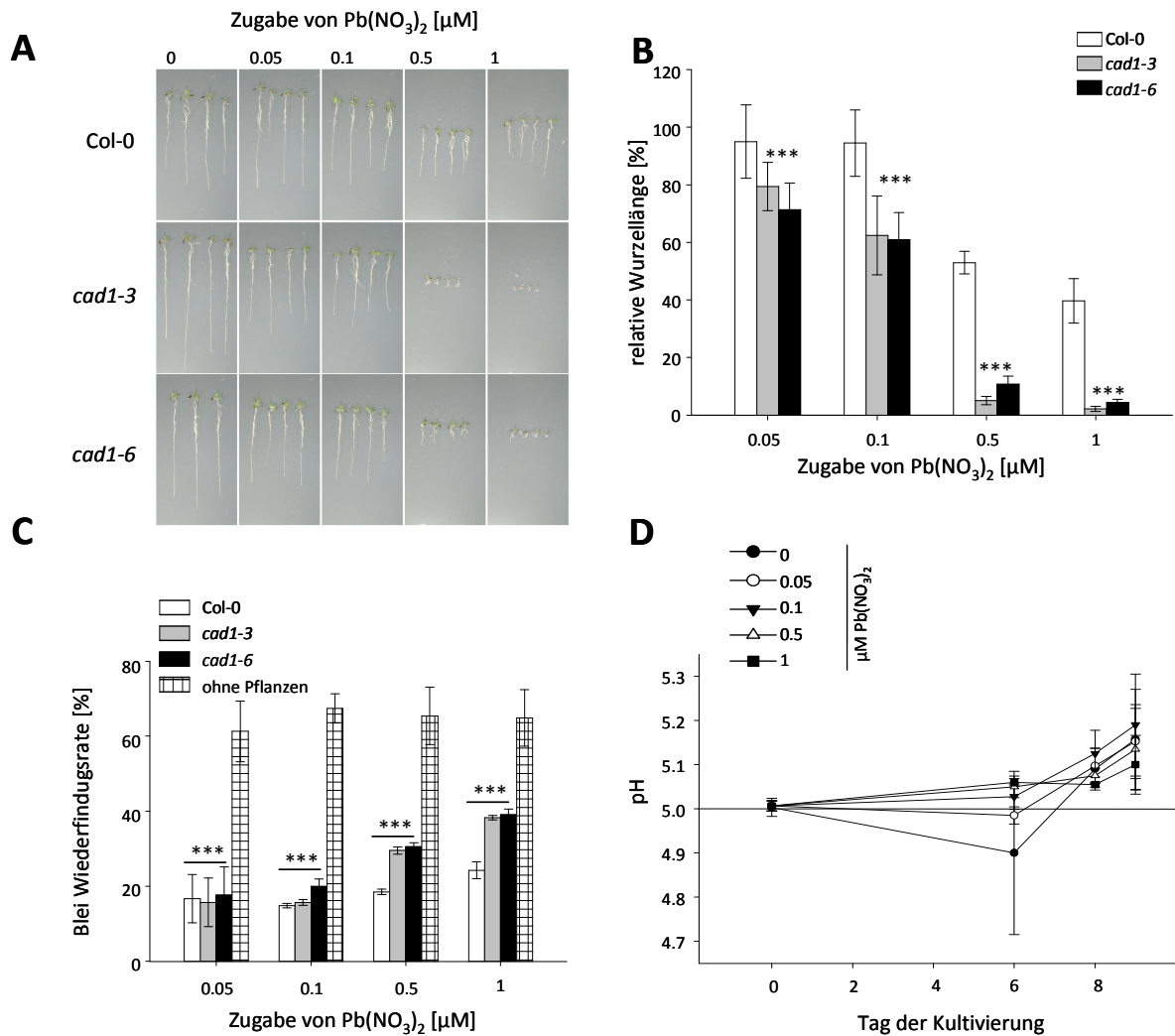
Größenordnungen höher als der von Kopittke ermittelte Toxizitätsschwellenwert von  $0.3 \mu\text{M}$  [45].

Um die Eigenschaften des Mediums in dieser Beziehung zu verbessern wurde ein neues System entwickelt bei welchem der pH von 5.7 auf 5.0 gesenkt wurde und die Phosphatkonzentration auf  $10 \mu\text{M}$  reduziert wurde. Diese entsprach einer Konzentration, in welcher Phosphate in einer Bodenlösung gefunden werden können und dadurch einer Situation, welcher Pflanzen unter natürlichen Bedingungen ausgesetzt sind.

### **2.2. Test eines neuen Wachstumsmediums zur Erfassung der Pb Toleranz unter umweltrelevanten Bedingungen**

Nach Reduktion des pH-Wertes und Phosphatgehaltes wurde zunächst die Stabilität des Systems unter den veränderten Bedingungen überprüft. Einer Erhöhung des pH-Wertes wurde durch einen Austausch des Mediums am Tag 6 und 8 des Versuches entgegengewirkt. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Keimlinge bereits ein genügend großes Wurzelgeflecht ausgebildet über das sie andernfalls, durch Abgabe von Ionen über die Wurzeloberfläche, den pH hätten beeinflussen können. Durch den Mediumswechsel wurden Schwankungen im pH auf einen Bereich von 4.9 bis 5.2 beschränkt (Abb. 57 D). Die Wiederfindungsrate von Blei wurde in dem neuen Medium (ohne vorhergehenden Pflanzenbewuchs) auf 60 – 70 % bestimmt (Abb. 57 C). Neben der verbesserten Löslichkeit von Blei zeigt sich auch, dass keine Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von den verwendeten Pb-Konzentrationen besteht. Für Konzentrationen von  $0.05$  bis  $1 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$  wurden gleiche Wiederfindungsraten ermittelt, was für die Stabilität des Systems sprach.

Trotz des suboptimalen pH-Wertes von 5.0 entwickelten sich die Pflanzen über den Versuchszeitraum hinweg gut, wenn auch mit einer geringeren Wachstumsrate als im  $1/2$  MS oder  $1/10$  Hoagland Medium. So wurden Wurzellängen von 40 mm erreicht, jeweils 20 mm und 23 mm weniger als im MS bzw. Hoagland Medium (Abb. 55, 56, 57). Bei einem Vergleich des Pflanzenwachstums im LPP Medium, mit der Bleitoleranz erfasst in den beiden klassischen Wachstumsmedien, fiel zunächst die erheblich geringere Bleikonzentration auf, welche zur Inhibierung des Wachstums führte (Abb. 57 A, B).



**Abb. 57:** Toxizität von Blei im LPP Medium. **(A)** Col-0 (WT) und die *cad1*-Mutanten (*cad1-3* und *cad1-6*) wurden auf Agarplatten ausgelegt und fotografiert, nachdem sie für 9 Tage in einem Flüssigsystem, in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Blei, kultiviert wurden. **(B)** Die relative Wurzellänge (% des Wachstums unter Kontrollbedingungen) wurde für 3 unabhängige Experimente ermittelt ( $n = 16-56$  Keimlinge). Gezeigt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die mittlere Wurzellänge von Col-0 unter Kontrollbedingungen betrug  $44.5 \pm 7.9$  mm, die von *cad1-3*  $49.2 \pm 9.9$  mm und von *cad1-6*  $51.6 \pm 5.4$  mm. **(C)** Dargestellt ist die Wiederfindungsrate von Blei im Wachstumsmedium, bestimmt mittels ICP-OES Messungen der zentrifugierten Lösungen. MW  $\pm$  SD mit  $n = 3$ . **(D)** Der Verlauf des pH-Wertes während des Versuches und in Abwesenheit von Pflanzen wurde graphisch dargestellt (MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Die horizontale Linie repräsentiert den Ausgangs pH von 5.0 vor Zugabe des  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Bereits bei 0.1  $\mu\text{M}$  war das Wachstum von Col-0 signifikant reduziert, bei 0.5  $\mu\text{M}$  erreichten die Wurzeln nur noch 60 % des Wachstums unter Kontrollbedingungen. Dieser Toxizitätsschwellwert stimmt sehr gut mit dem von Kopittke in einer Metastudie ermittelten Wert von 0.3  $\mu\text{M}$  überein [45]. Beide *cad1*-Mutanten zeigten eine deutliche Pb-Hypersensitivität im Vergleich mit Col-0. Bereits bei 0.05  $\mu\text{M}$  Bleinitrat trat ein, gegenüber Col-0 signifikant reduziertes Wachstum auf. Zwischen den Mutanten gab es keine Unterschiede in der Bleisensitivität. Der größte Unterschied in der Sensitivität war bei der

höchsten Bleikonzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen. Das Wachstum von Col-0 betrug unter diesen Bedingungen 40 %, das der *cad1*-Mutanten weniger als 10 %. Halbmaximale Inhibition war für Col-0 bei 0.5  $\mu\text{M}$  erreicht, für die *cad1*-Mutanten bereits bei 0.1  $\mu\text{M}$ .

### 2.3. Theoretischer Vergleich der drei Wachstumsmedien mit *Vminteq*

Die Löslichkeit und Speziation von Pb in den drei Medien wurde mit dem Programm *Vminteq* kalkuliert.

**Tab. 26:** Pb Fraktionen in den unterschiedlichen Wachstumsmedien. Präzipitationen wurden berechnet mit Hilfe der Datenbank *Vminteq*, angepasst mit Dissoziationskonstanten von L'Eplattenier *et al.* 1966 [243] und Yunta *et al.* 2012 [244], sowie nach ICP Messung des löslichen Anteils an Pb im Medium.

Medium	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Zugabe [ $\mu\text{M}$ ]	Komponente	theoretische Werte			ICP bestimmte Werte	
			Gesamt			Gesamt gelöst [ $\mu\text{M}$ ]	präzipitiert [%]
			Gesamt gelöst [ $\mu\text{M}$ ]	präzipitiert [ $\mu\text{M}$ ]	präzipitiert [%]		
1/2 MS	10	Pb <sup>+2</sup>	6.26	0	0.00	0.11	98.88
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	432.66	0	0.00		
	100	Pb <sup>+2</sup>	32.25	30.31	48.45	1.09	98.91
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	412.45	20.21	4.67		
	200	Pb <sup>+2</sup>	32.44	92.68	74.08	0.71	99.64
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	370.87	61.79	14.28		
	500	Pb <sup>+2</sup>	33.21	279.58	89.38	1.13	99.77
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	246.27	186.39	43.08		
	1000	Pb <sup>+2</sup>	37.37	588.21	94.03	9.17	99.08
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	40.52	392.14	90.64		
	10000	Pb <sup>+2</sup>	5606.70	648.99	10.37	7913.38	20.87
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0.00029	432.66	100.00		
1/10 Hoagland	0.1	Pb <sup>+2</sup>	0.06	0.00	0.00	0.01	88.65
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0.06	0.00	0.00		
	1	Pb <sup>+2</sup>	0.60	0.00	0.00	0.05	94.95
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	71.90	0.00	0.00		
	10	Pb <sup>+2</sup>	0.68	5.62	89.19	0.06	99.36
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	68.15	3.75	5.21		
	100	Pb <sup>+2</sup>	8.70	53.90	86.10	0.13	99.87
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	18.00	53.90	74.97		
LPP	0.05	Pb <sup>+2</sup>	0.03	0.00	0.00	0.03	38.71
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	7.19	0.00	0.00		
	0.1	Pb <sup>+2</sup>	0.06	0.00	0.00	0.07	32.56
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	7.19	0.00	0.00		
	0.5	Pb <sup>+2</sup>	0.31	0.00	0.00	0.33	34.57
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	7.19	0.00	0.00		
	1	Pb <sup>+2</sup>	0.63	0.00	0.00	0.65	35.12
		PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	7.19	0.00	0.00		

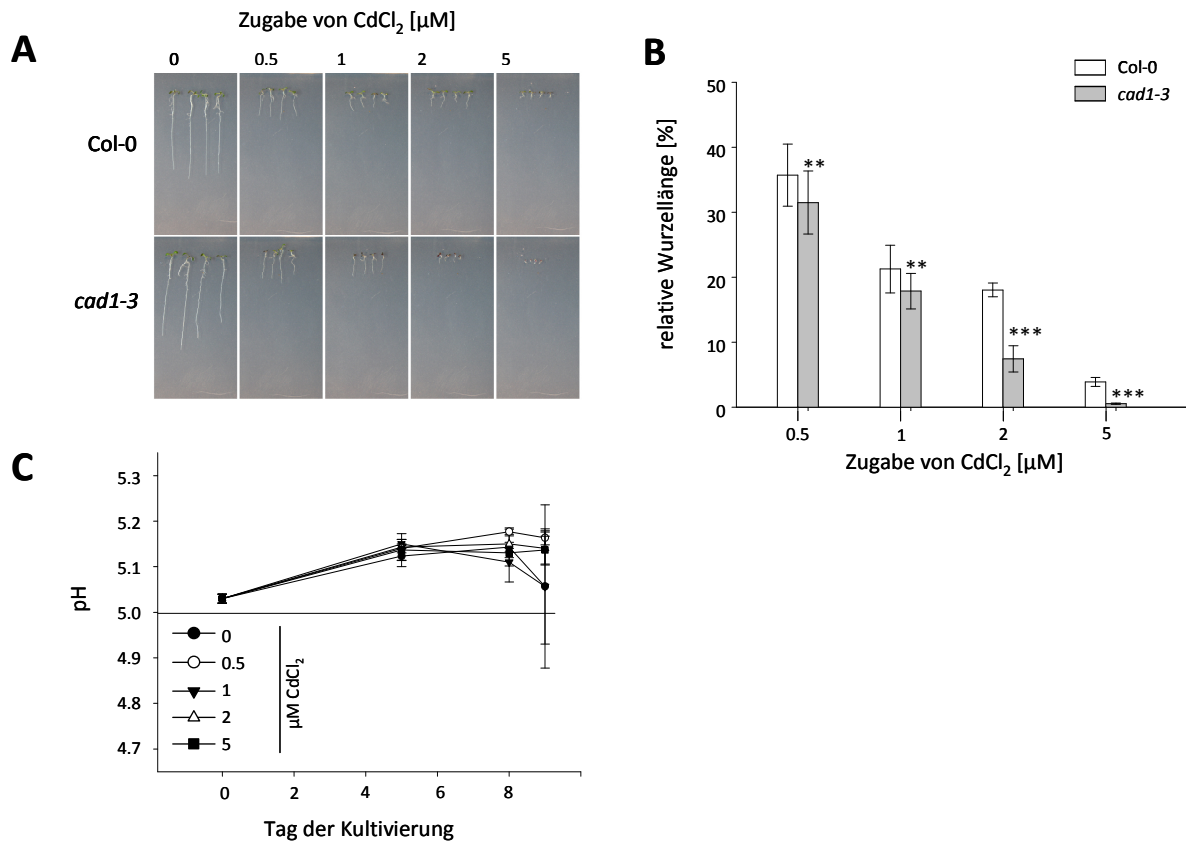
Dieses modelliert Metallspezies und -löslichkeiten in Abhängigkeit von den Ionenkompositionen der Lösung [245]. Für das 1/2 MS Medium wurden bereits ab Zugabe von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  Präzipitationen von 50 % des Pb und 5.7 % des Phosphates berechnet. Wurden 1 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  zugegeben waren 94 % des Pb und 90 % des  $\text{PO}_4$  präzipitiert, bei Zugabe von 10 mM dagegen war Pb erneut zu 90 % löslich, da 100 % des  $\text{PO}_4$  präzipitierte. Für höhere Konzentrationen stimmen diese errechneten Werte gut mit den über ICP Messungen bestimmten Präzipitationen überein. Durch komplette Präzipitation des  $\text{PO}_4$  ab Konzentrationen von 10 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  stieg die Bleilöslichkeit, welche bei geringeren Pb-Kontaminationen sehr gering war. Im Hoagland Medium traten Präzipitate laut *Vminteq* ab Pb-Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  auf, im LPP Medium dagegen bei keiner Konzentration.

### **2.4. Cd Toleranz im LPP Medium und Vergleich mit toxischen Konzentrationen anderer Systeme**

Zu Vergleichszwecken wurde die Toxizität von Cd im neu entwickelten Medium getestet (Abb. 58 A, B). Hier wurde das Wurzelwachstum vom Col-0 Wildtyp bei Zugabe von 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  zu 65 % reduziert. Der gut dokumentierte Cd-Hypersensitivitätsphänotyp von *cad1-3* [80, 82] war bei allen Konzentrationen, von 0.5 bis 5  $\mu\text{M}$ , zu sehen (Abb. 72). Die Entwicklung des pH-Wertes unterschied sich nicht von der Entwicklung beim Test der Pb-Sensitivität (vgl. Abb. 57 C und 58 C). Damit waren Wachstumsunterschiede aufgrund von Variationen im pH-Wert zwischen Versuchen mit unterschiedlichen Metallen ausgeschlossen.

Durch diesen Vergleich zeigte sich, dass das neue System neben der Erfassung der Pb-Sensitivität auch geeignet ist, um bekannte Phänotypen in Bezug auf andere Schwermetalle zu reproduzieren. Dabei stellte das System – zumindest im Hinblick auf die verfügbare Bleikonzentration sowie Phosphatkonzentrationen – eine Natur-ähnlichere Situation dar und bietet somit realistische Anhaltspunkte über die Bleitoleranz von Pflanzen in der Umwelt. Damit wurden die Voraussetzungen für die Erforschung einer Bleiaufnahme in Nutzpflanzen unter natürlichen Anzucht-Bedingungen geschaffen, die den Anfangspunkt der Mobilisierung von Blei in die menschliche Nahrung darstellen.



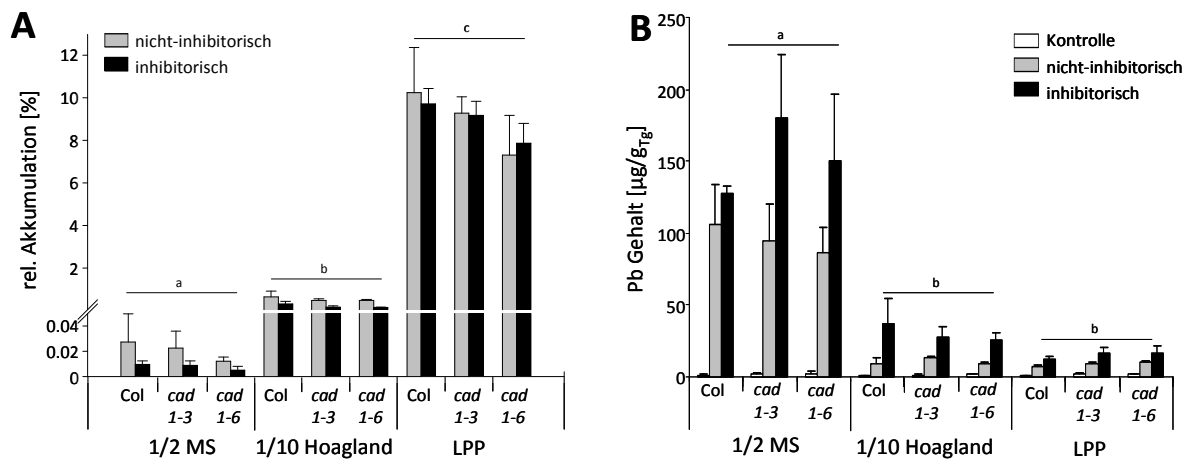


**Abb. 58:** Toxizität von Cadmium im LPP Medium. **(A)** Col-0 (WT) und die *cad1*-Mutante *cad1-3* wurden auf Agarplatten ausgelegt und fotografiert, nachdem sie für 9 Tage in einem Flüssigsystem, in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Cd, kultiviert wurden. **(B)** Die relative Wurzellänge (% des Wachstums unter Kontrollbedingungen) wurde für 3 unabhängige Experimente ermittelt (n = 32 - 46 Keimlinge). Gezeigt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Die mittlere Wurzellänge von Col-0 unter Kontrollbedingungen betrug  $46,9 \pm 6,2$  mm, die von *cad1-3*  $49,6 \pm 7,3$  mm. **(C)** Der Verlauf des pH-Wertes während des Versuches wurde graphisch dargestellt (MW  $\pm$  SD, n = 3). Die horizontale Linie repräsentiert den Ausgangs pH von 5.0 vor Zugabe des  $\text{CdCl}_2$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001.

## 2.5. Vergleich der Metallprofile von Pb gestressten, 9 Tage alten Keimlingen in den drei Medien

Neben dem Vergleich der Wurzellänge wurde die Metallakkumulation nach Pb-Stress in den drei Medien (1/2 MS, 1/10 Hoagland und LPP) verglichen. Die Anzucht erfolgte dabei im Falconsystem, der Mediumwechsel wurde wie für das 6-well System beschrieben durchgeführt. Für den Pb-Stress wurde die höchste nicht-inhibitorische und die niedrigste inhibitorische Konzentration für jedes Medium gewählt. Die relative Akkumulation wurde ermittelt als Verhältnis zur Gesamtmenge an Pb die den Pflanzen im Verlaufe des Versuches zur Aufnahme zur Verfügung stand (Abb. 59 A). Im MS Medium konnte sowohl unter nicht-

inhibitorischen als auch unter inhibitorischen Pb-Konzentrationen im Mittel 30mal weniger an rel. Akkumulation nachgewiesen werden als im Hoagland Medium. Im Vergleich zum LPP Medium war die rel. Akkumulation im MS Medium sogar 460 bis 1200mal geringer. Auch im Hoagland Medium wiesen die Pflanzen noch eine 16 bzw. 44fach geringere Akkumulation auf als im LPP Medium.

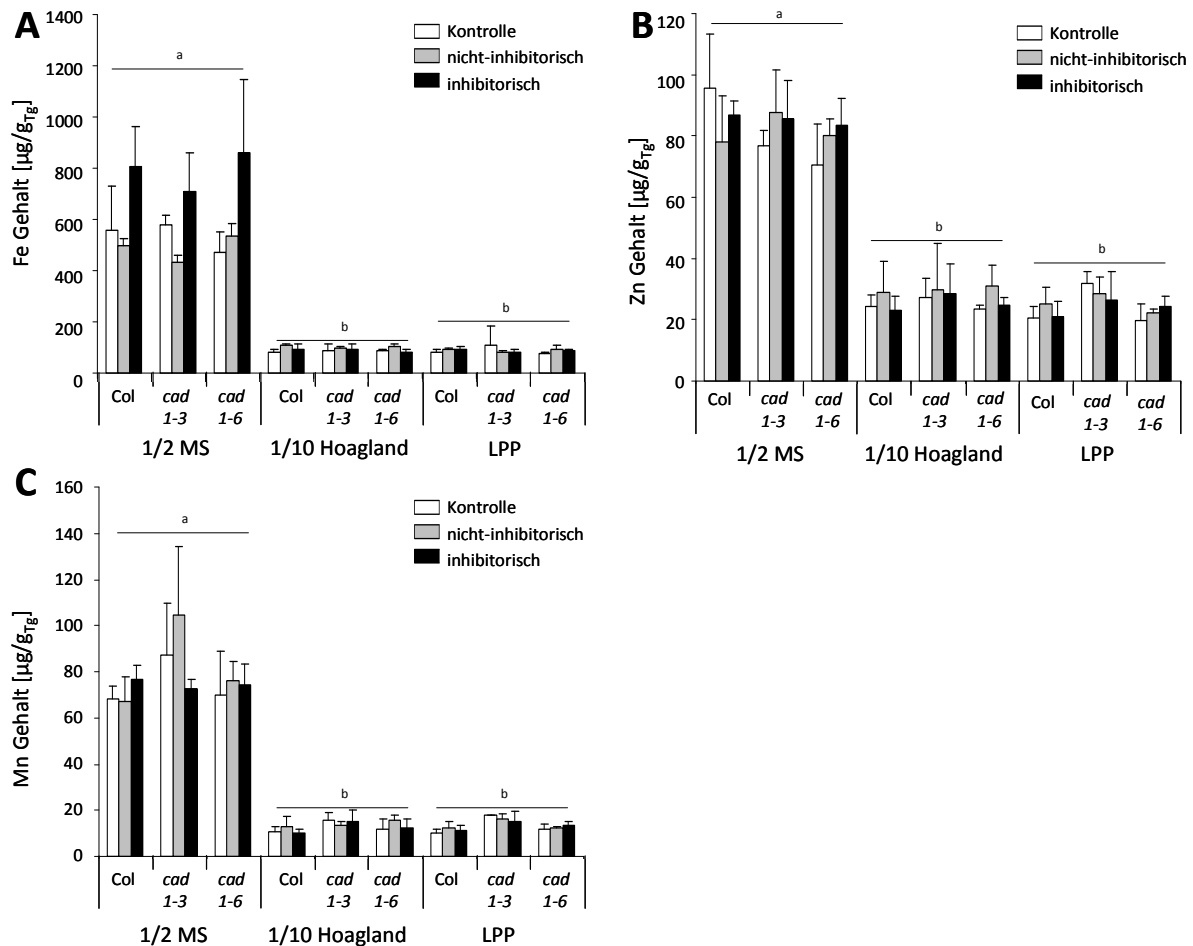


**Abb. 59:** Analyse der Pb Akkumulation in Col-0 und PCS1 defekten Keimlingen. Die Pflanzen wurden mit zwei, den jeweiligen Medientypen angepassten Pb Konzentrationen gestresst. Dafür wurde die höchste nicht-inhibitorische und die niedrigste inhibitorische Pb-Konzentration gewählt (MS: 200, 500 µM Hoagland: 1, 10 µM LPP: 0.05, 0.1 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **(A)** Relative Pb Akkumulation bezogen auf die Gesamtmenge an Pb welcher die Pflanzen während des 9-tägigen Wachstums ausgesetzt waren. **(B)** Pb Gehalt der Keimlinge. Angegeben sind Mittelwerte ± SD von n = 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede in der Akkumulation zwischen den Medien wurden ermittelt durch Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test p < 0.05.

Im MS Medium zeigten sich die höchsten absolute Pb Gehalte (Abb. 59 B). Grund dafür war die viel höhere Pb-Konzentration, welche für gleiche phänotypische Effekte im MS Medium gewählt werden musste. Bleigehalte in Keimlingen gestresst mit 1 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> im 1/10 Hoagland oder 0.05 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> im LPP Medium waren nahezu identisch. Auch hierin zeigte sich die bessere Bleiaufnahme im LPP Medium, welche durch die Verbesserung der Löslichkeit erreicht wurde. Unter Kontrollbedingungen lagen die Bleigehalte unter dem Quantifikationslimit.

Neben den Pb-Gehalten wurden die Gehalte der Mikronährstoffe in den gestressten Keimlingen ermittelt (Abb. 60). Für Fe, Zn und Mn zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem 1/10 Hoagland Medium, welches standardmäßig für die Anzucht von Pflanzen verwendet wird, und dem neu entwickelten LPP Medium. Im 1/2 MS Medium fanden sich höhere Fe, Zn und Mn-Gehalte. Dabei wurden die Mikronährstoffe, mit Ausnahme von Fe im 1/2 MS Medium, nicht durch den Pb-Stress beeinflusst. Für Fe zeigte sich ein leichter Anstieg

in den Keimlingen durch Behandlung mit inhibitorischen Pb-Konzentrationen. Genotyp-spezifische Unterschiede konnten für keines der Metalle in keinem der Wachstumsmedien gefunden werden.

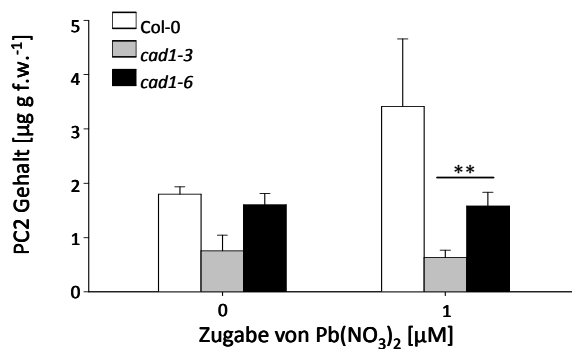


**Abb. 60:** Mikronährstoffgehalt der Pb gestressten Keimlinge. Die Pflanzen wurden mit zwei, den jeweiligen Medientypen angepassten Pb Konzentrationen gestresst. Dafür wurde die höchste nicht-inhibitorische und die niedrigste inhibitorische Pb-Konzentration gewählt (MS: 200, 500  $\mu\text{M}$  Hoagland: 1, 10  $\mu\text{M}$  LPP: 0.05, 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ). **(A)** Eisengehalt der Pb gestressten Keimlinge. **(B)** Zn-Gehalt von Col-0 und den *cad1*-Mutanten nach Pb Stress. **(C)** Mangangehalt der Keimlinge in Abhängigkeit vom Pb Stress und Medientyp. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Signifikante Unterschiede zwischen den Medien wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test berechnet.  $p < 0.05$

## 2.6. Aktivierung der Phytochelatinsynthese durch Blei

Durch die Hypersensitivität der *cad1*-Mutanten wurde die Beteiligung der Phytochelatine (PCs) an der Bleitoleranz bereits ersichtlich. Um festzustellen ob die Beteiligung von AtPCS1 an der Bleitoleranz durch eine Aktivierung der Phytochelatinsynthese (PCS) durch Blei

vermittelt wird, wurde die Phytochelatinbildung in Keimlingen untersucht (Abb. 61). Die Anzucht erfolgte im neu etablierten LPP Medium in Falcon Röhrchen. Dabei wurden Kontrollpflanzen mit bleigestressten Pflanzen verglichen.



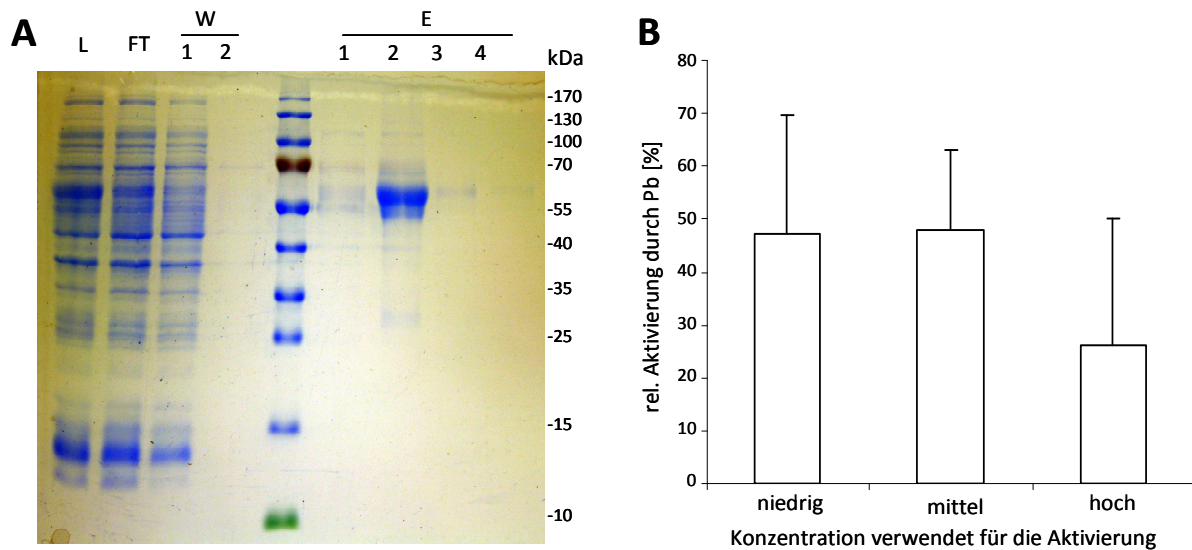
**Abb. 61:** *In vivo* Bildung von Phytochelatinen durch Pb-Behandlung. 1 Woche alte *Arabidopsis thaliana* Col-0, *cad1-3* und *cad1-6* wurden für 3 Tage einem Bleistress unterzogen. Nach Extraktion und Derivatisierung der Thiole wurden die Keimlinge mittels UPLC-ESI-QTOF-MS auf ihren PC2 Gehalt hin analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3). Signifikante Unterschiede wurden mittels zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*:  $p < 0.01$ .

Nur nach Zugabe von Bleinitrat zum Wildtyp Col-0 erfolgte eine Induktion der PC Synthese. Die beiden *cad1*-Mutanten zeigten einen signifikant geringeren PC2 Gehalt als Col-0. Bei ihnen führte die Bleibehandlung nicht zur Induktion der PC Synthese und der PC2 Gehalt lag nicht über dem unbehandelten Col-0-Keimlinge. Damit war ein direkter Zusammenhang zwischen Blei und der PC-Bildung nachgewiesen.

Die PC Synthese wird durch die Aktivierung des konstitutiv exprimierten PCS-Proteins durch Metallionen oder Metall-GS Komplexe ausgelöst [246, 247]. Um die Aktivierbarkeit des Enzyms durch Blei mit der durch Cadmium zu vergleichen, wurde das Enzym 6xHis-PCS1 rekombinant produziert und aufgereinigt. Cd ist als Aktivator der PC Synthese sehr gut untersucht. Aus diesem Grund ist ein Vergleich der Aktivierbarkeit von 6xHis-PCS1 durch Blei, mit der Aktivierbarkeit durch Cadmium, unter Bedingungen die die Löslichkeit von Blei kontrollieren, sinnvoll.

Nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung des Proteins (Abb. 62 A) über dessen N-terminalen His-Tag, konnte ein *in vitro* Aktivitätstest durchgeführt werden. Mittels SDS Gel wurde der Erfolg der Aufreinigung überprüft. Bereits in der 2. Waschfraktion konnten kaum noch Proteine, außer des ca. 58 kDa großen 6xHis-PCS1, nachgewiesen werden. Das Eluat 2 enthielt die höchste Konzentration an 6xHis-PCS1, erkennbar an der intensiven Bande auf

Höhe der Markerbande von 58 kDa. Verunreinigungen mit anderen Proteinen lagen wie in Abb. 62 A erkennbar nur in Spuren vor.



**Abb. 62:** *In vitro* Aktivitätstest von AtPCS1 **(A)** Dokumentation der rekombinanten Produktion von AtPCS1 und Aufreinigung des N-terminal His- getaggt, 58 kDa großen Proteins über eine Affinitätschromatographie. Auf einem SDS Gel sind Proteine des Bakterienlysat (L), des Säulendurchflusses (FT), der Waschfraktionen 1 und 2 (W1, W2) und der Eluate 1-4 (E) aufgetrennt. **(B)** Protein aus drei Aufreinigungen wurde für einen *in vitro* Aktivitätstest verwendet. 20 % höhere Bleikonzentrationen wurden dabei eingesetzt (niedrig: 1.2 und 1  $\mu$ M, mittel: 12 und 10  $\mu$ M, hoch: 120 und 100  $\mu$ M  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  bzw.  $\text{CdCl}_2$ ), nachdem die Löslichkeit von Blei im Aktivitätspuffer überprüft wurde. Dargestellt ist die mittlere relative Aktivierbarkeit von AtPCS1 durch  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  im Verhältnis zur Aktivierbarkeit durch  $\text{CdCl}_2$ .

In dem *in vitro* Aktivitätstest konnten Parameter wie lösliche Metallkonzentration und Zugänglichkeit des Enzyms für die zugegebenen Metalle kontrolliert werden. Der Aktivitätspuffer wurde, entsprechend der Anforderungen für Blei modifiziert und der pH reduziert. Die eingesetzte Menge an Blei wurde an die Löslichkeit im verwendeten Puffer angepasst. Diese lag bei 80 %, weshalb 20 % mehr Pb eingesetzt wurde um eine vergleichbare Konzentration zu Cd zu erhalten. Dessen Löslichkeit im Aktivitätspuffer lag bei 100 %. Die Enzymaktivität von 6xHis-AtPCS1 lag nach Pb Zugabe bei 25-50 % der Aktivität die durch Cd Zugabe erreicht wurde. Eine Erhöhung der Metallkonzentrationen veränderte das Verhältnisses der Pb- zur Cd- Aktivierbarkeit des Enzyms nicht signifikant (Abb. 62 B).

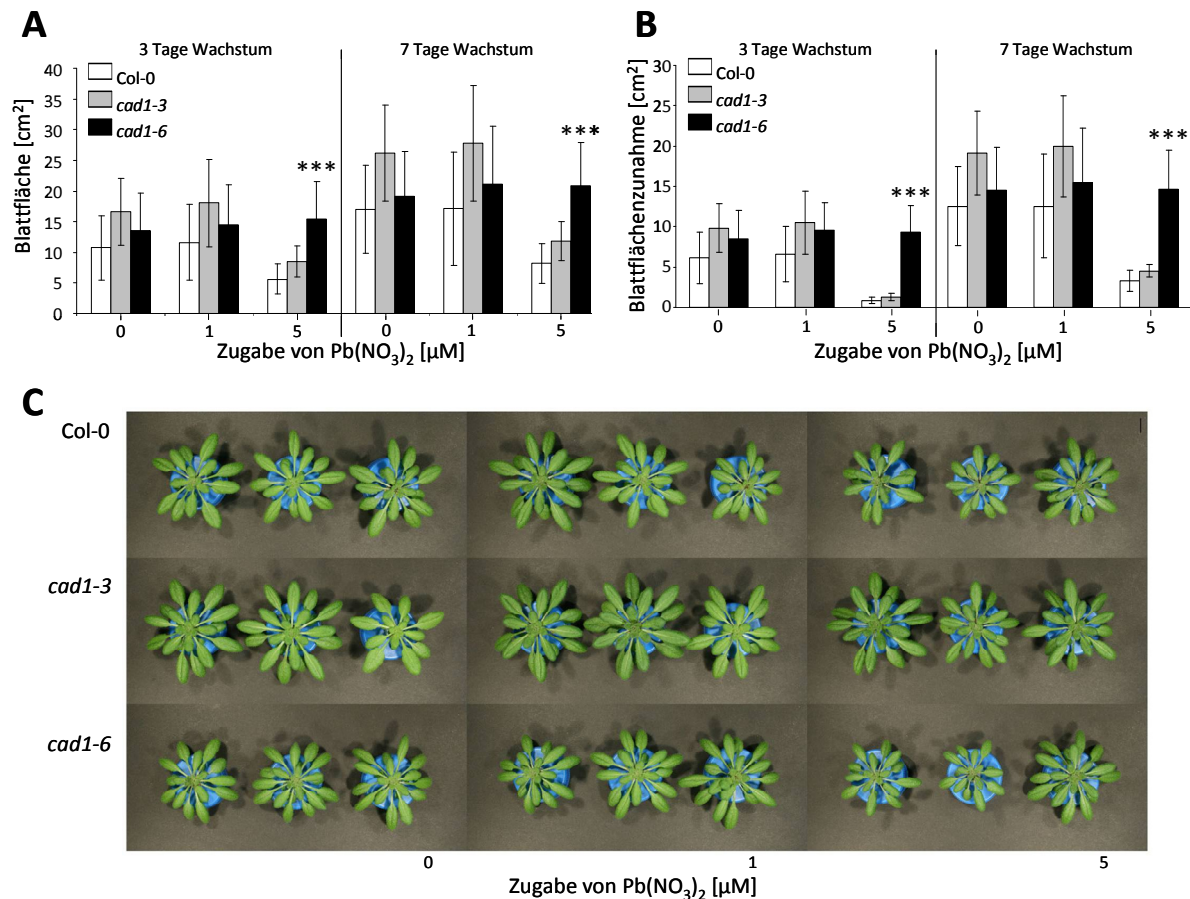
Durch die Anpassung des Aktivitätspuffers und der verwendeten Metallkonzentrationen für eine gleiche Löslichkeit der Metallionen, war hier ein direkter Vergleich der Aktivität des Enzyms vermittelt durch Blei oder Cadmium möglich.

## 2.7. Bleitoleranz und Metallprofil älterer Pflanzen im gering Phosphat/gering pH Medium

Nach der Erfassung des Blei-Sensitivitätsphänotyps der *cad1*-Mutanten im neuen Medium wurde dieses zur Analyse von älteren Pflanzen eingesetzt. Nach der hydroponischen Anzucht von Col-0 sowie *cad1-3* und *cad1-6* für 5 Wochen wurden die Pflanzen im LPP Medium Blei ausgesetzt. Die Wiederfindungsrate im Medium lag dabei zu Beginn des Experimentes bei  $64.21 \pm 3.48 \%$  und wurde auch nach jedem Mediumwechsel kontrolliert. Im Mittel lag sie nach Pflanzenbewuchs bei  $19.65 \pm 6.10 \%$ . Zwischen den Genotypen wurden keine Unterschiede detektiert.

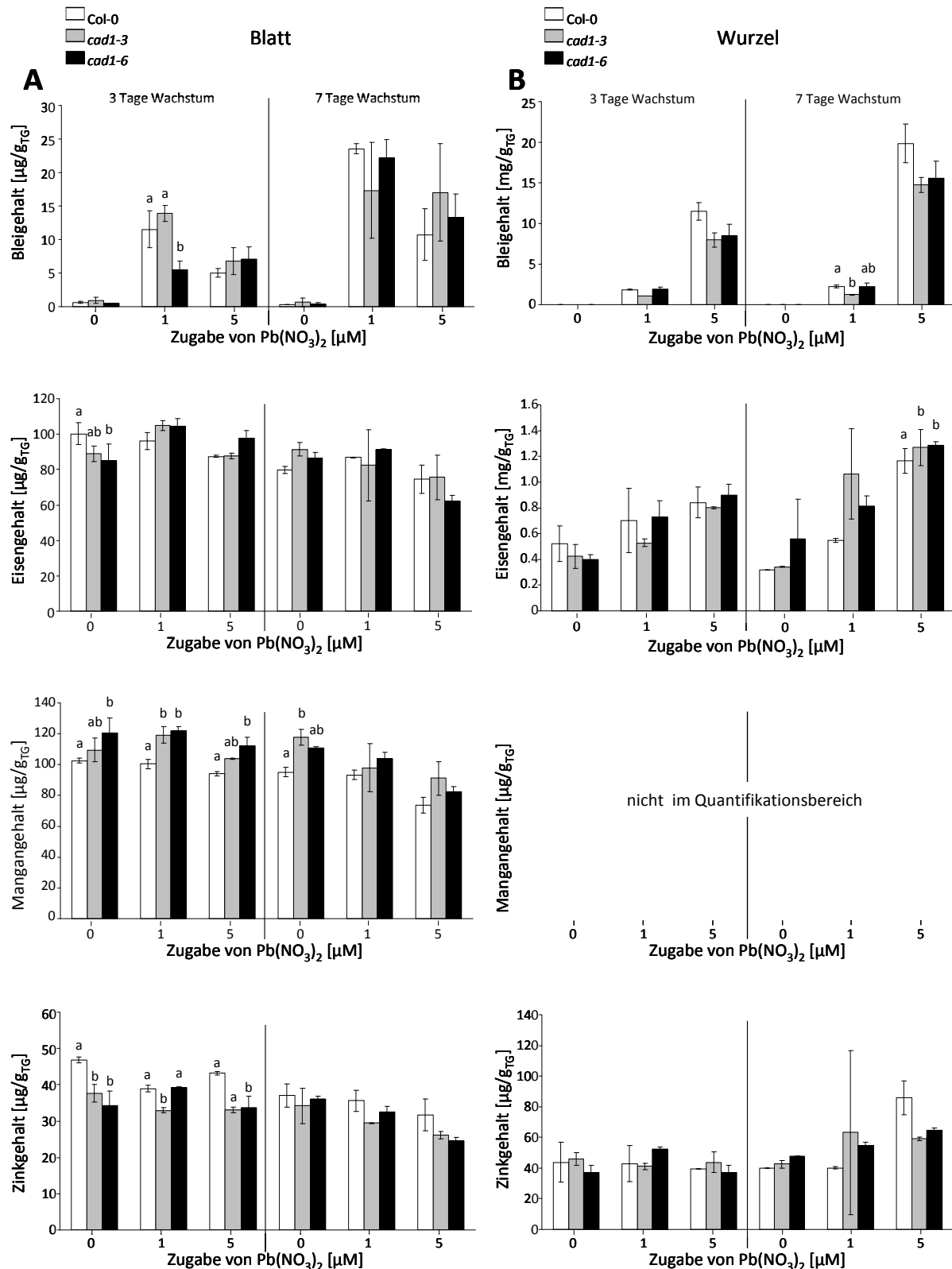
Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurde die Entwicklung der Blattfläche dokumentiert (Abb. 63). Die Ausgangsgröße der Pflanzen lag für Col-0 bei  $4.8 \pm 2.6 \text{ cm}^2$  (n= 118), für *cad1-3* bei  $7.2 \pm 2.8 \text{ cm}^2$  (n= 120) und für *cad1-6* bei  $5.7 \pm 3.0 \text{ cm}^2$  (n= 108). Der wachstumshemmende Effekt von Blei wurde insofern deutlich, dass die Blattfläche als auch die Blattflächenzunahme unter der höchsten verwendeten Bleikonzentration von  $5 \mu\text{M}$  geringer war als unter Kontrollbedingungen oder bei  $1 \mu\text{M}$  Bleistress. Dies wurde umso besser nach 7 Tagen Behandlung mit Bleinitrat sichtbar. Die Blattflächenzunahme zeigte jedoch nicht die erwartete Hypersensitivität der *cad1*-Mutanten gegenüber Blei. Es konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen Col-0 und *cad1-3* festgestellt werden, weder bei Endpunktauswertung der Blattfläche (Abb. 63 A) noch bei Einbeziehung der vorherigen Zeitpunkte und Berechnung der Blattflächenzunahme (Abb. 63 B). Col-0 entwickelte unter Kontrollbedingungen eine Blattfläche von  $17 \pm 7.1 \text{ cm}^2$ . Unter  $5 \mu\text{M}$  Bleistress waren die Pflanzen dagegen nur ca. halb so groß ( $8.2 \pm 3.3 \text{ cm}^2$ ). Das Wachstum der Mutanten *cad1-6* zeigte dagegen keinen Effekt von Blei. Blattfläche und Blattflächenzunahme waren auch nach 7 Tagen Behandlung mit  $5 \mu\text{M}$  Bleinitrat nicht beeinträchtigt im Vergleich zum Wachstum unter Kontrollbedingungen. In diesem System war kein negativer Einfluss von dem, in den *cad1*-Mutanten fehlendem AtPCS1 nachweisbar.

Nach Beendung des Wachstumsversuches wurde das Pflanzenmaterial geerntet und für die Metallmessung aufbereitet. Bleikonzentrationen unter Kontrollbedingungen lagen unter dem Quantifizierungslimit (Abb. 64 A, B). Zwischen den Genotypen konnten zum großen Teil keine Unterschiede im Metallprofil festgestellt werden. Nach 3tägiger Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  zeigte sich ein geringerer Bleigehalt im Blatt von *cad1-6*, nach weiteren 5 Tagen waren keine Unterschiede sichtbar.



**Abb. 63:** Wachstum von 5 Wochen alten Col-0 Pflanzen und der *cad1*-Mutanten im LPP Medium. **(A)** Die Blattfläche wurde 3 und 7 Tage nach Beginn des Versuches ermittelt und wurde in Abhängigkeit von der verwendeten Bleikonzentration dargestellt. **(B)** Die Blattflächenzunahme nach Pb-Stress, bezogen auf die Blattfläche zu Beginn des Experimentes, wurde nach 0 (Start des Pb-Stresses), 3 und 7 Tagen für jedes Individuum ermittelt und ist in Abhängigkeit der eingesetzten Bleikonzentration dargestellt. Es wurden zwei unabhängige Experimente ( $n = 18-40$ ) durchgeführt. Dargestellt sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$ . Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen wurden mittels zweifache-Varianzanalyse mit Tukey Test ermittelt. \*\*\*:  $p < 0.001$ . **(C)** Es sind jeweils 3 Individuen jedes Genotyp unter Kontrollbedingungen und Pb-Stress nach 7 Tagen Wachstum im LPP Medium.

Unter 5  $\mu\text{M}$  Bleistress konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen, weder nach 3 noch nach 7 Tagen, beobachtet werden. Wachstumsunterschiede schienen demnach nicht mit den Bleigehalten in Verbindung zu stehen. In der Wurzel wurden sehr hohe Bleigehalte gemessen und es bleibt die Frage offen, ob es sich hierbei um aufgenommenes Blei handelt oder um Präzipitation von Blei auf der Wurzeloberfläche in einer nicht-pflanzenverfügbaren Form. Bei der Analyse der Eisen-, Mangan- und Zinkgehalte im Blatt von bleigestressten Pflanzen zeigte sich tendenziell eine Abnahme die mit der Intensität des Bleistresses korreliert. Der Eisengehalt in der Wurzel steigt jedoch mit zunehmendem Bleistress. Genotypische Unterschiede schienen erneut nicht an die Behandlung mit Blei gebunden zu sein, sie traten auch unter Kontrollbedingungen auf.

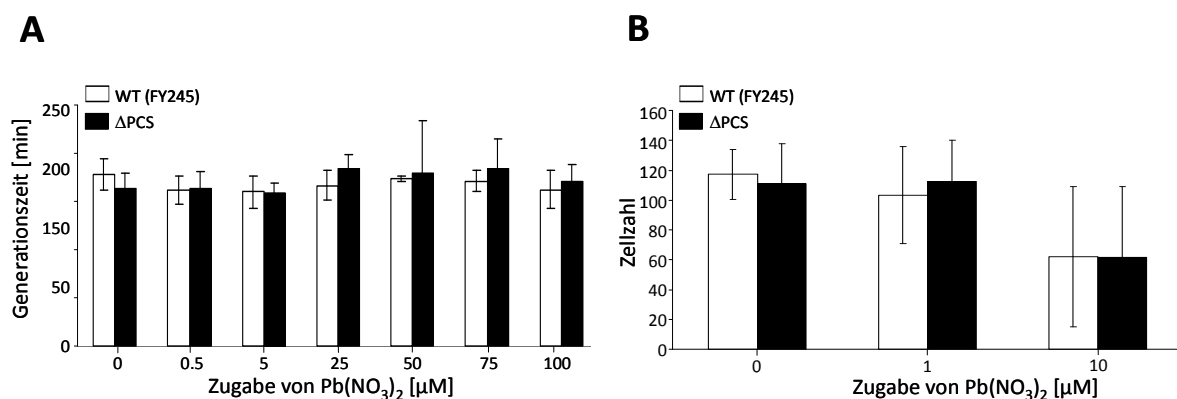


**Abb. 64:** Metallprofile von 5-6 Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen. ICP Messungen der Blatt- (A) und Wurzelproben (B) von Pflanzen, welche nach 3 bzw. 7 Tagen Bleibehandlung geerntet wurden. Vergleich der Genotypen Col-0, *cad1-3* und *cad1-6*. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD (n=2). Zweifache-Varianzanalysen mit Tukey Tests dienten der Ermittlung signifikanter Unterschiede im Metallgehalt zwischen den Genotypen. Kleinbuchstaben (a und b) kennzeichnen dabei Genotypen welche sich signifikant in ihrem Metallgehalt unter der jeweiligen Bedingung unterscheiden.



## 2.8. Bleitoleranz von Phytochelatinsynthese defizienten Hefen

Phytochelatinsynthasen kommen nicht nur in Pflanzen vor. Neben dem Nachweis der Relevanz von Phytochelatinen für die Detoxifikation von Blei in Pflanzen durch Etablierung eines neuen Kultivierungssystems, wurde deshalb auch die Bleitoleranz von Spalthefen untersucht. Dabei wurde das Wachstum des Wildtypstammes mit dem eines Phytochelatinsynthese-defizienten Stammes verglichen. Erneut wurde das Wachstumsmedium an die Anforderungen eines Blei-Wachstumstests angepasst. Die Phosphatkonzentration im EMM-Medium wurde von 15.5 mM auf 1.55 mM und der pH von 5.7 auf 4.2 reduziert. Daraus ergab sich eine Löslichkeit von 80 % des zugegebenen Pb bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$ . Im traditionellen EMM Medium lag diese dagegen nur bei 0.88 %. Mit steigender  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -Konzentration verringerte sich die Löslichkeit von Blei wie erwartet, blieb allerdings im Phosphat- und pH-reduzierten Medium stets höher als im normalen EMM-Medium. Bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  erreichte sie schließlich 7 % und 0.28 %.



**Abb. 65:** Die Bleitoleranz eines PCS defizienten Hefestammes wurde mit der Bleitoleranz des Wildtyps verglichen. **(A)** Ein Wachstumstest in bleihaltigem Medium erfasste die Teilungen der Hefen über einen Zeitraum von 24h. In 5 unabhängigen Versuchen wurde die Generationszeit aus jeweils 8 Hefekulturen eines Genotyps, unter zunehmenden Bleikonzentrationen, bestimmt ( $n=2-5$ ,  $n_{\text{total}}=16-40$ ). **(B)** Die Überlebensrate von Wildtypen als auch PCS defizienten Hefen wurde durch Bestimmung der Zellzahl nach Inkubation in  $\text{Pb}$ -Lösungen bestimmt.  $n=9$  aus 3 unabhängigen Versuchen.

In einem Wachstumstest wurde die Generationszeit von Hefen unter Bleistress ermittelt (Abb. 65 A). Es konnte kein Effekt von Blei auf das Wachstum der Zellen festgestellt werden. Auch PCS deletierte Hefen zeigten, unter Bleibehandlung, keine Veränderung in der Generationszeit. In einem zweiten Versuch, bei dem die Überlebensrate von Hefen nach Inkubation in einer Bleinitratlösung bestimmt wurde (Abb. 65 B), zeigte sich ebenfalls kein stabiler Effekt. Ein leichter Rückgang in der Zellzahl nach Inkubation in 10  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  war durch die hohen Fehler nicht signifikant.

### 3. Diskussion

Die Bleitoleranz wurde mit dem Ziel analysiert, ein System zu etablieren in welchem sie unter realistischen Konzentrationen erfasst werden kann. Dafür sollten die Bedingungen während des Experimentes kontrolliert und die Bleiverfügbarkeit verfolgt werden. So sollten Aussagen über Interaktionen von Blei und Pflanzen und damit letztlich über die Mobilität von Blei in der Umwelt möglich werden. Zum Zweiten sollte unter diesen realistischen Bedingungen die Rolle der Phytochelatine in der Bleidetoxifikation untersucht werden.

Um dies zu erreichen wurde ein LPP Medium etabliert bei welchem die Phosphatkonzentration auf 10  $\mu\text{M}$ , statt der im 1/10 Hoagland üblichen 100  $\mu\text{M}$ , reduziert und der pH von 5.7 auf 5.0 verringert wurde. Ein drittes Medium welches in den Vergleich mit einbezogen wurde, war das häufig verwendete 1/2 MS Medium welches, bei einem pH von ebenfalls 5.7, noch höhere Phosphatkonzentrationen von 620  $\mu\text{M}$  enthält.

Im flüssigen Medium konnte die Bleiwiederfindungsrate, wie von Kopittke *et al.* 2010 [45] vorgeschlagen, bestimmt werden. Dafür erwies sich die Zentrifugation des Mediums als bessere Methode um das präzipitierte Blei vom noch löslichen Blei zu trennen. Grund für die abweichenden Ergebnisse, erzielt durch Zentrifugation und Filtration ist die Eigenschaft von Blei auch mit anderen Anionen Präzipitate zu bilden. Weng *et al.* zeigten 2001 bei einer Analyse von unterschiedlichen Böden, dass die höchste Konzentration an löslichem und ungebundenem Blei in Böden mit dem geringsten Anteil an organischen Bestandteilen zu finden ist [248]. Die Filtration durch Zellulosefilter führte demnach wahrscheinlich zu einer Verfälschung der Messung. Durch den Filter wurden weitere Bleiionen gebunden, welche im Medium noch gelöst waren. Auf der andern Seite konnten sehr hohe Bleikonzentrationen nicht vollständig vom Filter zurückgehalten werden. Durch die Verbesserung der Detektion der löslichen Bleifraktion konnte im LPP Medium eine 80 %ige Wiederfindungsrate ermittelt werden im 1/2 MS Medium lag sie dagegen nur bei 0.1 %.

Zunächst wurde das generelle Wachstum in den drei Medien verglichen. Im LPP Medium entwickelten die Pflanzen sich gut, wenn auch etwas langsamer als im 1/10 Hoagland oder 1/2 MS Medium. So erreichte der Wildtyp Col-0  $61.2 \pm 7.9$  mm im 1/10 Hoagland,  $62 \pm 6.9$  mm im 1/2 MS Medium und  $44.5 \pm 7.9$  mm im LPP Medium. Um den Einfluss von

Phytochelatinen auf die Bleitoleranz zu erfassen wurde die Toleranz zweier PC defizienter Mutanten (*cad1-3* und *cad1-6*) erfasst. Dabei wurde zunächst das Wachstum unter Kontrollbedingungen im 1/10 Hoagland und LPP Medium verglichen. Beide Mutanten wuchsen mit  $61.5 \pm 5.5$  mm und  $64.2 \pm 8.1$  mm,  $59 \pm 8$  mm und  $61 \pm 6.2$  mm sowie  $49.2 \pm 9.9$  mm und  $51.6 \pm 5.4$  mm nicht anders als der WT im jeweiligem Medium. Durch diesen Vergleich kann ein genereller Wachstumseffekt, verursacht durch die fehlenden bzw. reduzierten PCs in den Mutanten ausgeschlossen werden.

Die *cad1*-Mutanten weisen Defekte in dem Gen *AtPCS1* auf. Dieses codiert für das Enzym PCS, welches für die Bildung von Phytochelatinen (PCs) aus GSH sorgt. Diese werden für die Detoxifikation von Schwermetallen benötigt [78]. Dabei wurde *cad1-3* ursprünglich als PC-frei identifiziert [80], während die vermutlich verkürzte *AtPCS1* in *cad1-6* noch geringe Mengen an PC2 in den Wurzeln synthetisieren kann [82]. Später konnte durch sensitivere PC Messungen gezeigt werden, dass auch in *cad1-3* noch geringe Mengen an PC2, unabhängig von einer Metallexposition der Pflanzen, gebildet werden [83]. Grund hierfür ist das *AtPCS1* homologe Gen *AtPCS2*, welches für eine geringe, basale Aktivität der PCS sorgt. Erst in einer *cad1-3/atpcs2* Doppelmutante, welche weder ein funktionales *AtPCS1* noch ein funktionales *AtPCS2* Gen besitzt, ist keinerlei PC Bildung mehr nachzuweisen.

Ein Vergleich der Blei-Toleranz der *cad1*-Mutanten mit ihrem WT im 1/2 MS Medium ergab keine Wachstumsunterschiede. Bis  $200 \mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  war kein Effekt von Pb auf das Wachstum feststellbar. Bei dieser Konzentration waren im MS Medium weniger als 0.5 % (entspricht  $1 \mu\text{M}$ ) löslich. Bei höheren Konzentrationen von 500 und  $1000 \mu\text{M}$  zeigte sich ein Effekt auf das Wachstum des WT und der Mutanten gleichermaßen. Wurde die Bleitoleranz dagegen im 1/10 Hoagland Medium erfasst, wurden Wachstumsunterschiede bereits bei Konzentrationen von  $10 \mu\text{M}$  sichtbar. Zudem zeigte sich auch eine Hypersensitivität der *cad1*-Mutanten gegenüber Pb. Dies wies auf eine Rolle der PCs bei der Bleidetoxifikation in Keimlingen hin. Trotz dieser Hinweise auf einen Einfluss von PCs auf die Bleidetoxifizierung, lag die Konzentration welche im 1/10 Hoagland Medium für eine Wachstumsinhibition von ca. 50 % benötigt wurden noch zwei Größenordnungen über der von Kopittke *et al.* 2010 [45] in deren Metastudie ermittelten. Auch im 1/10 Hoagland Medium war Blei schlecht löslich, und die Toxizität konnte aufgrund sekundär auftretender Veränderungen im Pb-kontaminierten Medium nicht gut eingeschätzt werden.

Die Toleranzanalyse im LPP Medium zeigte dagegen bereits bei 0.05  $\mu\text{M}$  eine Verringerung des Wachstums der *cad1*-Mutanten und 0.5  $\mu\text{M}$  waren ausreichend um das Wachstum von Col-0 um mehr als 40 % zu reduzieren. Unter diesen Bedingungen war im LPP Medium mehr als 60 % des zugegebenen Bleis löslich. Mit Hilfe des Programms *Visual Minteq* wurde für alle, in diesem Medium verwendeten  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  Konzentrationen eine 100 %ige Löslichkeit errechnet. Neben Blei- und damit Phosphatwiederfindungsraten war auch der pH-Wert sehr stabil und unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Bedingungen. Die beobachtete Wachstumsreduktion war damit ausschließlich auf die Toxizität des Pb zurückzuführen. Die geringere Bleiwiederfindungsrate in Medium welches Pflanzen enthielt, war auf die Bindung von Pb an die Wurzeloberfläche zurückzuführen. Wie eingangs bereits erläutert interagiert Pb mit organischen Bestandteilen im Medium [248], so auch den Zellwänden.

Neben der Pb-Toxizität konnte auch der Effekt anderer Metalle verlässlich im neuen LPP Medium erfasst werden. Die wurde gezeigt, indem die gut erforschte Cd-Sensitivität von *cad1-3* [u.a. 82, 83] im neuen System bestätigt wurde.

Auch die Metallaufnahme wurde zwischen den drei Systemen verglichen. Unter Kontrollbedingungen konnte in keinem der Medien Blei in den Keimlingen nachgewiesen werden. Fe, Zn und Mn-Gehalte waren nach Wachstum im MS Medium ca. 3fach höher als nach Wachstum im Hoagland und LPP Medium. Zwischen diesen wurden keine Unterschiede sichtbar. Ersteres ist der höheren Konzentration an Spurenelementen zuzuschreiben, zweiteres zeigt einmal mehr, dass Pflanzen im LPP Medium durch die suboptimalen Wachstumsbedingungen nicht an Mangelernährung leiden. Des Weiteren wurden die Keimlinge in jedem Medium mit zwei Konzentrationen an  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  gestresst welche jeweils den gleichen Effekt auf den Phänotyp hatten. Zum einen wurde die höchste nicht-inhibitorische Konzentration gewählt und zum anderen die kleinste inhibitorische. Dabei zeigten sich große Unterschied in den Bleigehalten, begründet in den unterschiedlichen Konzentrationen mit welchen die Keimlinge gestresst wurden. Im MS Medium konnten 2.3 – 23 fach höhere Bleigehalte gemessen werden. Da der verwendete Bleistress jedoch beim 20 – 10000fachen lag, ist die relative Akkumulation, in Bezug auf die Menge an Pb der die Keimlinge ausgesetzt waren, im MS Medium am geringsten und im neuen LPP Medium am höchsten. Dies verweist auf die bessere Verfügbarkeit von Pb im LPP Medium, wohingegen andere Metalle in ihrer Verführbarkeit nicht beeinflusst sind.

Wurden ältere Pflanzen im neuen LPP Medium mit Pb gestresst, wurden höhere Konzentrationen benötigt um einen Wachstumseffekt zu erzeugen. Bei 5  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  zeigten Col-0 und *cad1-3* ein geringeres Wachstum als unter Kontrollbedingungen, nicht jedoch *cad1-6*. Dieses unterschied sich signifikant vom Wachstum von Col-0 und *cad1-3*. Der fehlende Unterschied zwischen Col-0 und *cad1-3* weist darauf hin, dass PCs in älteren Pflanzen für die Detoxifikation von Pb eine untergeordnete Rolle spielen. Für Mtp1, einen vakuolären Zn-Transporter, konnte beispielsweise mit zunehmendem Alter der Pflanzen eine Verringerung der Expression, außer in den teilungsaktiven Zellen der Wurzelspitzen, gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden dahin gehend interpretiert, dass Mtp1 vor allem in jungen Pflanzen relevant für die Zn-Akkumulation in der Blattvakuole ist [104]. Natürlich könnte Pb in älteren Pflanzen auch anders transportiert werden. Phytochelatine detoxifizieren nur cytosolischen Pb. Ist es dagegen im Apoplast lokalisiert, dann sind PCs nicht an der Komplexbildung beteiligt. Somit könnte auch das in älteren Pflanzen veränderte Verhältnis von Zellwandvolumen zur Pb-Konzentration einen Effekt auf die Pb-Detoxifikation haben. Die Zellwand bindet und lagert Schwermetallionen. Zum Beispiel ist in der Wurzel des Zn-hypertoleranten Hyperakkumulator *Thlaspi caerulescens* bis zu 30 % des Zinks in der Zellwand gebunden [25]. Auch für Pb konnte eine Interaktion mit der Zellwand und dadurch folgende geringere Translokation in den Spross gezeigt werden [249]. In *Lemna minor* L. wurde die Bildung von Calloseeinlagerungen in der Wurzelzellwand durch Pb-Ionen induziert. Ausgehend von der Lage der Calloseeinlagerungen und des Pb wurde geschlossen, dass die Callosebildung als Barriere gegen den Pb-Transport in die inneren Wurzelzellen dienen könnte [207]. In wiefern der Toleranzphänotyp von *cad1-6* mechanistisch begründbar ist, oder vielleicht nur auf einen geringfügigen Größenunterschied zu Beginn des Pb-Stresses zurückzuführen ist, der den Pflanzen aufgrund einer höheren Biomasse ein größeres Volumen zur Detoxifikation derselben Pb-Menge zur Verfügung gab, muss noch erfasst werden.

Pb-Gehalte der Pflanzen sind abhängig von der Pb-Behandlung. In der Wurzel wurde bis zu 1000fach mehr Pb eingelagert als im Spross. Dies spricht für eine sehr geringe Translokation von Pb, ein Resultat was mit den vorangegangenen Überlegungen gut erklärbar ist. Pb wird schon in der Wurzel, eventuell in deren Zellwänden, immobilisiert und steht damit für einen Transport nicht zur Verfügung. Ob hierbei die Zellwände eine größere Rolle spielen als die Detoxifikation von Pb-PC<sub>n</sub> Komplexen in der Wurzelvakuole ließe sich durch einen Vergleich

der Pb-Akkumulation in *cad1-3* und der *abcc1/2* Doppelmutante feststellen. Die ABCC1/2 Transporter sind im Tonoplast lokalisiert und transportieren hier Metall-PC<sub>n</sub> (As(III), Cd(II) und Hg(II)) Komplexe in die Vakuole [98, 99, 101]. Auch für Pb wird ein hypersensitiver Phänotyp, und damit ein Transport dieses Substrates vermutet (vorläufige Ergebnisse: Brehm 2014, pers. Kommunikation). Wird ein signifikanter Anteil des Pb in der Wurzelvakuole in Form von PC-Komplexen gespeichert, sollte die *abcc1/2* Doppelmutante eine höhere Bleitranslokationsrate aufweisen als Col-0 oder *cad1-3*. Auch der Fe-Gehalt war abhängig von der Pb-Behandlung. Nach 7-tägigem Stress mit 5 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> war der Fe-Gehalt in den Blättern signifikant geringer als der von Pflanzen kultiviert unter K-Bedingungen und mit 1 µM Pb-Stress. In den Wurzeln von Pb-gestressten Pflanzen trat bereits nach 3 Tagen der umgekehrte Zustand ein, es war signifikant mehr Fe messbar. Pb beeinflusste demnach die Eisentranslokation. Das Wurzel/Spross Verhältnis stieg durch eine Pb-Behandlung auf das 15fache an, wie auch das Zn Wurzel/Spross Verhältnis. Jedoch zeigte sich durch die Pb-Behandlung nur eine ca. 2fache Veränderung in der Zn-Translokation. Der Mn-Gehalt war nach 7 Tagen Pb-Stress mit 5 µM signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen. Es ließ sich jedoch für Mn keine Veränderung des Wurzel/Spross Verhältnisses ermitteln was dafür spricht, dass Pb nicht die Mn-Translokation sondern die Aufnahme beeinflusst. Pb interferiert demnach mit der Homöostase von sowohl Fe, Zn als auch Mn. Möglicherweise wird die Aufnahme aller drei Metalle beeinflusst. Basierend auf dem veränderten Wurzel/Spross Metallgehalt von Zn und Fe könnte es jedoch sein, dass nur die Translokation von Zn und Fe durch Pb gestört wird. Mn könnte jedoch, sobald es einmal aufgenommen wurde, über andere Mechanismen in der Pflanze verteilt werden mit welchen Pb nicht interferiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass Pb zum Beispiel über dieselben Transporter wie Fe in die Wurzel aufgenommen wird. Durch eine Konkurrenz der Metalle registriert die Pflanze, dass weniger Eisen aufgenommen werden kann, und verstärkt die Eisenaquirierung. Dieser Hypothese zufolge müssten Eisentransporter wie IRT1 unter Pb-Stress stärker exprimiert werden. Neben der Aufnahme kann die Sequestrierung von Zn und Fe durch die Pb-Behandlung verändert sein. Dadurch kann das Wurzel/Spross Verhältnis ebenso beeinflusst werden. Außerdem wäre eine Konkurrenz der Ionen bei der Beladung des Xylems als Erklärung für eine Beeinflussung der Translokation denkbar. Durch die Aufnahme von Pb könnten weiterhin Verteidigungsmaßnahmen der Zellen gegenüber toxischen Schwermetallen induziert werden. Dazu gehören wie oben erwähnt die Bildung

mechanischer Barrieren wie Callosedepositionen [207] und die Induktion von Transportern wie *ABCC1* und 2. Für diese konnte in Col-0 und in Ws-2 eine Induktion nach As-Stress nachgewiesen werden [147]. Ein vermehrter As-Transport in die Vakuole durch eine Induktion der Expression führt zu einer verbesserten Toleranz. Ein Nachweis von vermehrtem Pb-Transport in die Vakuole von Col-0 Wurzelzellen könnte durch Färbung von Pflanzen mit dem Farbstoff Leadmium<sup>TM</sup> Green erfolgen. Frühere Versuche die das Ziel hatten die Relevanz der Transporter für die Bleidetoxifikation, sowie eine veränderte Verteilung von Pb in der Mutanten nachzuweisen, zeigten keinen phänotypischen Unterschiede der im MS Medium kultivierten *Arabidopsis*-Pflanzen [101]. Erste Wachstumsversuche mit der *abcc1/2* Doppelmutante im neu entwickelten LPP Medium zeigten jedoch einen extrem Pb-sensitiven Phänotyp. Dem zu folge sind die Transporter möglicherweise in der Lage auch Pb-PC Komplexe in die Vakuole zu transportieren und tragen so auch zur Pb-Toleranz bei (pers. Kommunikation J. Brehm 2014). Neben Wachstumsunterschieden zwischen Col-0 und der *abcc1/2* Doppelmutante könnte durch die suboptimalen Bedingungen im MS Medium auch ein Unterschied in der Pb-Verteilung maskiert werden. Eine Färbung von Pb-gestressten *abcc1/2* Keimlingen könnte einen weiteren Hinweis auf die Pb-PC Transportaktivität der ABC Transporter geben.

Die Analyse des Phytochelatingehaltes der im LPP Medium angezogenen Keimlinge ergab größere Mengen an PC2 im Pb-gestressten Col-0 WT. Dadurch wurde belegt, dass Pb unter physiologisch relevanten Konzentrationen von 1  $\mu$ M, wie sie in Bodenlösungen vorkommen [51], die Bildung von Phytochelatinen induziert. Damit ist die Konzentration von Pb welche für eine Aktivierung der PC-Produktion notwendig ist 700 bis 3000fach geringer als bisher in Zellkulturen [84, 250] oder ganzen Pflanzen gezeigt wurde [251–253]. Für *cad1-3* konnten sehr geringe PC2 Gehalte von unter 1  $\mu$ g/g<sub>Fg</sub> detektiert werden. Dabei wurde keine Induktion unter Pb-Stress festgestellt. In *cad1-6* war ebenfalls keine Induktion der PC2 Synthese detektierbar. Diese Ergebnisse stützen vorherige Analysen nach denen festgestellt werden konnte, dass das zweite PCS Gen in *A. thaliana* für eine basale Expression von Phytochelatinsynthase und damit PC Produktion sorgt. Die Aktivität von PCS2 wurde dabei nicht durch die Anwesenheit von Schwermetallen induziert. Dieses Protein war konstitutiv aktiv [83]. So wurden auch in der AtPCS1 defizienten *cad1-3* Mutante durch AtPCS2 geringe Mengen an PCs gebildet.

Um eine Aktivierung von PCS1 durch Pb direkt nachzuweisen, wurde die PC-Bildung vermittelt durch Cd und Pb in einem *in vitro* Aktivitätstest verglichen. Es wurde 20 % mehr Pb eingesetzt, um gleiche Metallkonzentrationen zu erhalten. Die genaue Metallverfügbarkeit für das Enzym kann nicht bestimmt werden, da nicht bekannt ist in welcher Form die Metallionen zur Aktivierung an das Enzym binden. So postulierten Vatamaniuk *et al.* 2000, dass die Aktivität nicht durch freie, hydratisierte Metallionen, sondern durch Metall-Thiolkomplexe oder auch in gänzlicher Abwesenheit von Metallen durch Gluthation-ähnliche Peptide mit reduzierter Thiolgruppe induziert wird [246]. Oven *et al.* zeigten 2002, dass neben Gluthation-Metallkomplexen, diverse andere Thiol-Metallkomplexe auch zur Aktivierung des Enzyms beitragen [247]. Die Anpassung der Pb Konzentration kann demnach nur eine Annäherung an eine Situation sein, in welcher dem Enzym Pb und Cd in gleicher Form zur Aktivierung zur Verfügung stehen. Die Pb-Aktivität lag bei 25 – 50 % im Vergleich zur Aktivität nach Cd-Zugabe und steht damit ca. im selben Verhältnis wie von Vatamaniuk *et al.*, 2000 beobachtet. Auch hierin zeigte sich eine 5fach höhere Aktivität vermittelt durch  $\text{CdCl}_2$  als durch  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Anders als bei Grill *et al.*, der 1987 zeigte, dass 10fach höhere Pb-Konzentrationen zu ähnlichen Phytochelatingehalten führten [84]. Grund für diese Unterschiede könnte die hohe Phosphatkonzentration in dem von Grill *et al.* verwendeten Medium sein, in welchem 1.2 mM Kaliumdihydrogenphosphat enthalten sind.

Um die Relevanz von Phytochelatinen für die Pb-Detoxifikation in einem zweiten System nachzuweisen, wurden Hefen in einem Minimalmedium mit 1/10 der üblichen Phosphatkonzentration mit Pb gestresst. Aus den Generationszeiten ergaben sich keine Unterschiede für das Wachstum der WT Hefen und des PCS defizienten Stammes. Die Bestimmung der Überlebensrate von Zellen, inkubiert in einer wässrigen Pb-Lösung, zeigte den negativen Effekt von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , jedoch wurden keine Unterschiede zwischen den Hefestämmen deutlich. Die inhibitorische Konzentration lag weit unter der bisher in Standard-Wachstumsmedien verwendeten Konzentration. So setzten Gravot *et al.*, 2004 45 mM für einen Wachstumseffekt auf „yeast nitrogen base“ Medium (Sigma) mit 2 % (w/v) Galaktose und 1 % (w/v) Raffinose ein [126], Song *et al.*, 2003 1.8 mM im 1/2 YPD Medium [254], Lee *et al.*, 2003 verwendete 2 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  auf synthetischem 1/2 Gal-Medium [255]. Durch hohe Phosphatkonzentrationen in den Medien, war dabei nur ein kleiner Teil des zugegebenen Pb für die Zellen verfügbar. Zudem entstehen sekundäre Effekte durch die



Präzipitation von Bleiphosphat. Eine Reduktion der Phosphatkonzentration erzielte auch im Hefemedium eine bessere Verfügbarkeit und machte dadurch die Toxizität von Pb schon bei geringeren Konzentrationen deutlich. Die Relevanz von Phytochelatinen für die Detoxifikation von Pb in Hefen konnte jedoch nicht demonstriert werden. Hier scheinen andere Detoxifikationswege relevanter zu sein.

Das hier etablierte LPP Medium ist sehr gut geeignet um die Toleranz von *A. thaliana* auf Pb zu untersuchen. Das zeigte sich einmal an der verbesserten Pb Löslichkeit, wodurch andere Medieneigenschaften wie der pH oder die Phosphatkonzentration in Lösung wenig beeinflusst werden. Zum anderen zeigte es sich an der geringen Konzentration bei welcher eine Wachstumsreduktion für Col-0 sichtbar wurde. Andere Studien verwendeten 1000fach höhere Konzentrationen um sichtbare Effekte zu erzeugen [101, 256–258]. Im neuen LPP Medium zeigte sich die Toxizität von Pb. Diese war mit unter 1  $\mu\text{M}$  vergleichbar mit der Toxizität von Quecksilber und stärker als die von Cd [45]. Dabei zeigte sich bereits in der Metastudie von Kopittke, dass nur 4 Studien die den Effekt von Pb untersuchten, diese realistischen Konzentrationen verwendeten. Für andere Metalle wie Ni, Cu, Cd und Mn konnten 20 bis 30 Studien in die Analyse der mittleren Toxizitäten der Metalle mit einbezogen werden. Mit dem hier entwickelten LPP Medium können nun einige der bisher beschriebenen Pb-Phänotypen neu erfasst werden. So zeigte sich, dass die *A. thaliana* Mutanten *ein2-1*, *etr1-1*, *pen3-1* und *pen3-4* [256, 257, 259] nicht hypersensitiv auf Pb reagierten [231], anders als bisher angenommen.

Wie kam es dann zu den bisher beschriebenen „Blei-sensitivitäts-“ Phänotypen? Vermutlich werden diese durch die sekundären Veränderungen verursacht, die im Medium auftreten wenn dieses mit Unmengen an Blei versetzt wird. Beispielsweise erzeugte die Zugabe von 10 mM Bleinitrat zum 1/2 MS Medium einen starken Anstieg in der Wiederfindungsrate auf 79 %. Dies ist ein Indiz dafür, dass sämtliches enthaltenes Phosphat durch das Blei präzipitiert wurde. Diese Messungen wurden auch durch Errechnung der Bleispezifizierung im MS Medium mit dem Programm *Visual Minteq (Vminteq)* bestätigt. Auch hier wurde bei Zugabe von 1 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  eine 90 %ige und bei Zugabe von 10 mM eine 100 %ige Präzipitation des Phosphates ermittelt. Diese drastische Reduktion der verfügbaren Menge des Makroelements Phosphat beeinflusst möglicherweise das Wachstum einiger Mutanten stärker. Neben der Phosphatkonzentration ist ein weiterer wachstumsbeeinflussender

Faktor der pH-Wert. Auch hier konnten Unterschiede zwischen Kontrollmedium und Pb-enthaltendem Medium detektiert werden. Durch die Zugabe des  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  erfolgte eine dosisabhängige Reduktion des pH-Wertes. Die Verringerung des pH Wertes kann das Wurzelwachstum der Keimlinge beeinflussen. Beispielsweise führt im Ökotyp Ler-0 die Verringerung des pHs auf 4.8 zu einer deutlichen Verringerung der Wurzellängen [260]. Für Mutanten könnte diese Beeinflussung noch drastischer ausfallen, und für die Unterschiede unter Blei-Stress im MS Medium verantwortlich sein.

Das Gen *Ein2* (*ethylen insensitive*), für welches eine Rolle in der Pb-Toleranz aufgrund der erhöhten Pb-Sensitivität der *ein2*-Mutanten vermutet wurde [256], ist benannt nach der Ethylen Insensitivität, welche durch die Mutation hervorgerufen wird. Ein positiver Einfluss von Ethylen auf die, durch Cd reduzierte Photosyntheserate konnte von Masood *et al.* 2012 gezeigt werden [154]. Ethylen induziert, neben der GSH Produktion auch die Mn-Superoxid Dismutase (SOD). GSH ist ein Substrat für die Produktion von PCs, welche essenziell in der Detoxifikation von Cd sind. Die Mn-SOD katalysiert die Reaktion von Superoxidanionen  $\text{O}_2^-$  zu Sauerstoff und  $\text{H}_2\text{O}_2$  und detoxifiziert damit das extrem reaktive Superoxid, welches den Photosyntheseapparat schädigt und damit die Photosyntheserate reduziert. Die Bildung dieser „*reactive oxygene species*“ (ROS) wird durch die Anwesenheit von Cd in der Zelle induziert [176]. Diese Verbindung von Ethylen und Cd, legte nahe, dass auch für Pb ein entsprechender Mechanismus existieren könnte, zudem auch für As eine Verbindung zur Ethylenwahrnehmung gezogen werden konnte [147]. Frühere Studien beschäftigten sich aus diesem Grund mit der Analyse der Pb-Toleranz von ethyleninsensitiven Mutanten [256]. Nach Berücksichtigung der neueren Ergebnisse im LPP Medium nach denen die Mutanten nicht Pb-hypersensitiv sind [231] scheint klar, dass es einen solchen Zusammenhang für Pb nicht gibt. Dies könnte darauf hinweisen, dass Pb in den Keimlingen auf anderen Wegen detoxifiziert wird, zum Beispiel durch Interaktion mit Pektinen und Lagerung in der Zellwand [167]. Dadurch würde weniger GSH bei der Detoxifikation von Pb benötigt und eine Anpassung der Schwefelassimilation wäre nicht erforderlich. PEN3 oder PDR8 ist ein ABC Transporter für welchen mehrere Mutationen beschrieben sind. *pen3-1* trägt einen Nukleotidaustausch der zum AS Austausch in der konservierten ABC Signatur in PEN3 führt, *pen3-4* eine T-DNA Insertion nahe dem 5' Ende der codierenden Region wodurch PEN3 nicht exprimiert wird [261]. Reduktion von PEN3 Expression führte zur Cd- und Pb-Hypersensitivität [257] im 1/2 MS Medium, nicht jedoch im LPP Medium [231]. Pb-

Detoxifikation durch Export von Pb aus dem Cytoplasma in den Apoplast wie es für Cd gezeigt wurde ist damit für Pb nicht von Relevanz. Ein Pb-Export involviert möglicherweise andere Transporter. Auch für PDR12, einen weiteren ABC Transporter der Plasmamembran, wurde ein Effekt auf die Pb-Toleranz beschrieben. Da auch in diesem Versuch 1/2 MS Medium und damit unphysiologisch hohe Konzentrationen von 700 bis 750  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  verwendet wurden [262], wäre eine Überprüfung des Pb-spezifischen Phänotyps der *pdr12* Mutante und PDR12 Überexpressionslinie im LPP Medium von Interesse. Für die ABC Transporter ABCC1 und C2 konnte im 1/2 MS Medium kein Effekt auf die Pb-Toleranz gezeigt werden [101]. Wie bereits erwähnt, lassen Versuche im LPP Medium dagegen vermuten, dass die *abcc1/2*-Mutante auch Pb-hypersensitiv reagiert (Brehm 2014, pers. Kommunikation). Dies legt eine Detoxifikation der PC-Pb Komplexe in der Vakuole durch ABCC1 und C2 nahe, wie sie für As, Hg und Cd gezeigt wurde [98–101]. Für diese Hypothese werden aktuell Hinweise gesammelt. Zum Beispiel wird die Metallakkumulation und –translokation in diesen Mutanten untersucht. Des Weiteren, soll eine Färbung der Wurzelzellen die subzelluläre Lokalisation von Pb im WT und der Doppelmutante illustrieren und zeigen, ob noch ein Transport von Pb in die Vakuole stattfindet.

Blei (Pb) ist ein hoch toxisches Schwermetall und ein großes Umweltverschmutzungsproblem, da es über die Mobilisierung durch Pflanzen in die menschliche Nahrungskette gelangt. Aus diesem Grund müssen wir die Pb-Aufnahme und die Verteilung in der Pflanze verstehen lernen. Bisher fehlten die erforderlichen Werkzeuge um Pb-Effekte auf Pflanzen verlässlich untersuchen zu können da in Standardmedien Pb, aufgrund seiner komplexen Chemie, in weitestgehend unverfügbarer Form vorliegt. Durch die Etablierung des LPP Mediums wurde die Löslichkeit von Pb stark verbessert, wodurch erstmals die Relevanz von PCs bei der Detoxifikation von Pb nachgewiesen werden konnte.

## Materialien und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1. Wachstumsmedien

Salze und andere Nährstoffe wurden in deionisiertem Wasser gelöst. Für die Deionisierung wurde die Advantage A10 Milli-Q-Anlage (Millipore, Billerica, USA) verwendet. Die Zusammensetzung der Medien kann Tab. 27 entnommen werden.

**Tab. 27:** Medienzusammensetzung

Medium	Bestandteile (Mengenangaben beziehen sich auf 1l Volumen; * in festen Medien)
LB	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, (15 g Agar)*
YEP	10 g Pepton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl, (15g Agar)*
1/10 Hoagland	100µM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 200µM MgSO <sub>4</sub> ; 280µM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 600µM KNO <sub>3</sub> ; 5µM Fe-HBED; 1%w/v Saccarose; 5mM MES; pH 5.7
1/10 Hoagland für Wachstum in Falcons (modifiziertes Hoagland Medium)	87.1µM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 200µM MgSO <sub>4</sub> ; 400µM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 600µM KNO <sub>3</sub> ; 5µM Fe-HBED; 4.63µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0.032µM CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O; 0.915µM MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O; 0.077µM ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; 0.011µM MoO <sub>3</sub> ; pH 5.7
1/2 MS	2.2g MS + Vitamine; 10g Saccarose; 0.5g MES; pH 5.7
LPP	10µM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 90µM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; 200µM MgSO <sub>4</sub> ; 280µM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 600µM KNO <sub>3</sub> ; 5µM Fe-HBED; 1%w/v Saccarose; 5mM MES; pH 5.0
LPP Medium für Wachstum in Falcons	8.71µM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 79.2µM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ; 200µM MgSO <sub>4</sub> ; 400µM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 600µM KNO <sub>3</sub> ; 5µM Fe-HBED; 4.63µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0.032µM CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O; 0.915µM MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O; 0.077µM ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; 0.011µM MoO <sub>3</sub> ; 5mM MES; pH 5.0
Schwefelmangelmedium	Zusammensetzung des 1/10 Hoagland Mediums. Ausnahme: 200µM MgSO <sub>4</sub> ersetzt durch 200µM MgCl <sub>2</sub>
EMM	14,7 mM Kaliumhydrogenphthalat; 15,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 93,5 mM NH <sub>4</sub> Cl; 2 % (w/v) Glucose; 1,7 mM Adenin; 1,7 mM Leucin; 2 mM Uracil; 5,2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 99,8 µM CaCl <sub>2</sub> ; 13,4 mM KCl; 0,282 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 4,2 µM Pantothersäure; 81,2 µM Nicotinsäure; 55,5 µM Inositol; 40,8 nM Biotin; 8,09 µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 2,37 µM MnSO <sub>4</sub> ; 1,39 µM ZnSO <sub>4</sub> ; 0,74 µM FeCl <sub>3</sub> ; 0,247 µM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ; 0,602 µM Kaliumiodid; 0,16 µM CuSO <sub>4</sub> ; 4,76 µM Citrat
YESS	5 g Hefeextrakt; 30 g Glucose; 100 mg Adenin; 100 mg Leucin; 100 mg Uracil; 100 mg Cystein; 1 (w/v) Agar

#### 1.2. Chemikalien, Oligonukleotide, Enzyme

Alle Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwendet. Sie stammen sofern nicht anders angegeben von den Firmen Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Sigma-Aldrich), Grüssing (Filsum), Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe). Enzyme und Kit's stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific (ehemals Fermentas) und Affymetrix.

Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Darmstadt) synthetisiert. Die Sequenzen können im Anhang Tab. 1 eingesehen werden.

### 1.3. Organismen und Plasmide

Es wurden neben *Arabidopsis thaliana* Ökotypen und Mutanten, *Saccharomyces cerevisiae* Hefen und *Escherichia coli* sowie *Agrobacterium tumefaciens* Bakterien verwendet. In Tab. 28 erfolgt eine Auflistung der Stämme. Des Weiteren sind die Plasmide welche für die Klonierung verwendet wurden aufgeführt.

**Tab. 28:** Verwendete Organismen und Vektoren

Art	Ökotyp/ Mutante/ Stamm	Genotypische Information	Herkunft
<b>Pflanzen</b>			
<i>A. thaliana</i>	Bur-0	Core 8	ABRC Seed Center
<i>A. thaliana</i>	Col-0	Core 8	ABRC Seed Center
<i>A. thaliana</i>	Cvi-0	Core 8	ABRC Seed Center
<i>A. thaliana</i>	Ler-0	Core 8	ABRC Seed Center
<i>A. thaliana</i>	RV	RIL Population Bur-0 X Col-0 Nachkommen der 2. Generation der RIL	Simon <i>et al.</i> , 2008
<i>A. thaliana</i>	T	RV243 X Col-0	vorliegende Arbeit
<i>A. thaliana</i>	X	RIL Population Cvi-0 X Ler-1 Nachkommen der 2. Generation der RIL	Alonso-Blanco <i>et al.</i> , 1998
<i>A. thaliana</i>	Z	X142 X Ler-0	vorliegende Arbeit
<i>A. thaliana</i>	Mwg-3		Kollektion eines neuen Ökotypen 2005 durch A. Trampczynska, pers. Kommunikation Fischer <i>et al.</i> , in Vorbereitung
<i>A. thaliana</i>	CM	RIL Population Mwg-3 X Col-0	Howden <i>et al.</i> , 1995
<i>A. thaliana</i>	<i>cad1-3</i>	<i>AtPCS1</i> Mutante	Tennstedt <i>et al.</i> , 2009
<i>A. thaliana</i>	<i>cad1-6</i>	<i>AtPCS1</i> Mutante	
<i>A. thaliana</i>	<i>stop1</i>	<i>AtSTOP1</i> (sensitive to proton rhizotoxicity 1) Mutante	luchi <i>et al.</i> , 2007
<i>N. tabacum</i>			
<b>Bakterien</b>			
<i>E. coli</i>	DH 10B	F– mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F 80dlacZ D M15D lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D (ara, leu)7697 galU galK – rpsL nupG	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i>	One Shot® TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit
<i>E. coli</i>	BL21AI	F-ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA	Invitrogen Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA
<i>A. tumefaciens</i>	GV3101	Gm <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	Koncz & Schell, (1986)
<b>Vektoren</b>			
Topo Entry Vektor	pCR®8/GW/TOPO®	Kan <sup>r</sup>	Invitrogen pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit
Destination Vektor	pMDC123 Cassette C1	Basta <sup>r</sup>	Curtis <i>et al.</i> , 2002
	pMDC43 Cassette C1	2x35S,gfp6, Hyg <sup>r</sup>	Curtis <i>et al.</i> , 2003
Expressionsvektor	pJC40	T7 Prom, T7 Term, Amp <sup>r</sup> , col E1 ori	Clos <i>et al.</i> , 1994

## **2. Methoden**

### **2.1. Kultivierung von *E. coli***

Die Bakterien wurden bei 37 °C inkubiert. Dazu wurden sie auf festem LB Medium ausplattiert oder in flüssigem LB resuspendiert und bei 180 rpm in einem New Brunswick Inkubationsschüttler kultiviert. Selektion erfolgte unter Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/µl Spectinomycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin.

### **2.2. Kultivierung von *A. tumefaciens***

Die Bakterien wurden bei 28 °C, auf festem LB Medium oder flüssigem LB oder YEP Medium inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 50 µg/ml Rifampicin und 25 µg/ml Gentamicin, sowie 50 µg/ml Kanamycin nach erfolgter Transformation der Bakterien mit dem Kanamycin-Resistenz-Marker enthaltendem Plasmid.

### **2.3. *Saccharomyces cerevisiae***

Die Hefe-Stämme ΔSpPCS [263] sowie der WT (FY245) wurden bei 30°C in flüssigem EMM Medium, sowie auf YE5S Platten mit 1% Agar inkubiert. Dabei wurden sie mit den Aminosäuren Adenin, Histidin, Leucin, und Cystein supplementiert.

#### **2.3.1. Wachstumstest**

Zellen wurden aus einer Vorkultur in EMM - Uracil (Ura) Medium in das Testmedium überführt. Es wurde eine Start OD von 0.25 eingestellt. Das Medium enthielt 1/10 der Phosphatkonzentration in Vergleich zu normalem EMM Medium (1.55 statt 15.5 mM) und hatte einen reduzierten pH (von 5.7 auf 4.2). Es war mit Bleinitrat in aufsteigenden Konzentrationen versetzt worden (0 – 100 µM). Die Kulturen wurden zu je 100 µl in Vertiefungen einer 96-*well* Platte ausgebracht. Über 24 h hinweg wurde die Zunahme der OD<sub>600</sub> mittels eines auf 30°C temperierten *Elisa Readers* (Power Wave X 340, Bio-Tek Instruments INC.) verfolgt. Nach je 15 min erfolgte eine Messung in deren Vorfeld die 96-*well* Platte mit höchster Intensität geschüttelt wurde. Aus den abgeleiteten Wachstumskurven wurde die Generationszeit berechnet.

### 2.3.2. Überlebenstest

Aus einer Übernachtskultur in EMM Medium wurde eine 1.5 ml Tag-Kultur in EMM Medium mit einer OD von 0.1 angeimpft. Nach 4-stündigem Wachstum erreichte diese eine OD von ca. 3. Um die Anzahl nicht vitaler Zellen weiter zu reduzieren wurde daraus erneut eine Tag-Kultur in EMM Medium mit einer OD von 0.1 angeimpft. Nach weiteren 3 h Wachstum lag die OD bei 0.2. Die Kultur wurde zentrifugiert (3000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge, RT, 6 min) das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in Wasser auf eine OD von 0.2 gelöst. Aus dieser Hefesuspension wurden 200 µl in 2 ml Wasser verdünnt und verschiedenen  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  Konzentrationen eingestellt (0 – 10 µM). Nach 90 min Inkubation bei 80 rpm und 30°C wurden die Zellen 1:100 in EMM Medium verdünnt und in Triplikaten ausplattiert. Nach 2-tägiger Inkubation wurden die Kolonien ausgezählt und die Überlebensrate im unter Bleistress im Vergleich zu Kontrollbedingungen ausgewertet.

## **2.4. Kultivierung von *A. thaliana***

### 2.4.1. Pflanzenanzucht in Erde

Für die Nachzucht von Pflanzen wurden Samen auf einer Mischung aus Substratboden und Vermiculit (6:1) ausgelegt, befeuchtet und für 48 h bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden sie zur Entwicklung von Rosetten für ca. 3-4 Wochen unter Kurztagbedingungen (8h Licht/ 16h Dunkelheit) bei 22°C und 60 % Luftfeuchte kultiviert, wobei die Keimlinge nach 1-2 Wochen vereinzelt wurden. Durch den Transfer in Langtagbedingungen (16h Licht/ 8h Dunkelheit) wurde die Blüte induziert und die Samenreife erreicht.

Für den experimentellen Vergleich des Wachstums verschiedener Ökotypen/ Mutanten auf Erde wurden spezielle Bedingungen gewählt. Siehe 2.6. Erdexperimente.

### 2.4.2. Pflanzen Wachstumstest auf festem Medium

Für die Erfassung des Wachstums (Wurzellänge oder/und Sprossgewicht) unter verschiedenen Stressbedingungen wurden Pflanzen auf Hoagland Medium kultiviert. Oberflächensterilisierte Samen wurden auf 1 % Typ-A Agar enthaltendem Medium, verschiedenen Metallen in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Für die Zusammensetzung siehe 1.2.

Für die Oberflächensterilisation wurden die Samen für 30 - 45 min unter Chlorgasatmosphäre (Natriumhypochlorit: Salzsäure; 2 : 1) in einem Exsikkator inkubiert. Das Chlorgas wurde anschließen abgepumpt (1 h) und die Samen wurden für weitere 20 min in einer sterilen Umgebung gelagert um das verbleibende Chlorgas rückstandslos zu entfernen. Nach Stratifikation bei 4°C für 48 h wurden die, auf Agar- Platten ausgelegten Samen vertikal in einer Langtagklimakammer (16h Licht/ 8h Dunkelheit, 22°C, 40% Luftfeuchte) aufgestellt. Nach ca. 14 Tagen Wachstum, wurde das Wurzelwachstum und in einigen Fällen auch das Sprossgewicht, erfasst.

### 2.4.3. Pflanzen Wachstumstest in Flüssigmedium - das Falconsystem

In diesem System lassen sich Pflanzen als Keimlinge oder als 3-6 Wochen alte Pflanzen kultivieren. Die Oberflächensterilisation wurde wie unter 2.4.2. Pflanzen Wachstumstest auf festem Medium durchgeführt.

In Hoagland Medium mit 1 % Saccharose wurden oberflächensterilisierte Samen stratifiziert. Anschließend keimten die Samen für eine Woche unter Langtagbedingungen und waren dabei einem kontinuierlichem Schütteln von 90 rpm ausgesetzt. Dem Medium konnten dabei, zur Induktion einer Stressantwort, auch Schwermetalle zugesetzt werden (siehe 1.1. Wachstumsmedien Tab. 28).

Für die Kultivierung von älteren Pflanzen wurden zunächst Keimlinge herangezogen. Es wurden 200 µl Reaktionsgefäße mit 0.5 % Agar (Typ- A) enthaltendem, modifiziertem Hoagland Medium befüllt und nach der Erstarrung des Mediums die Spitze der Reaktionsgefäße gekappt. Dies ermöglichte den Keimlingen die Wurzel durch den Agar hindurch in das flüssige Medium zu entwickeln. Die Reaktionsgefäße wurden in mit modifiziertem Hoagland gefüllte Spitzenkästen, mit transparentem Deckel, gesteckt und die sterilisierten *Arabidopsis* Samen auf die Oberfläche des festen Mediums gelegt. Nach Stratifikation wurden die Samen zur Keimung in Percival Klimaschränke transferiert und nach drei Wochen unter Kurztagbedingungen (8h Licht/ 16h Dunkelheit) bei 100 % Luftfeuchte und 22°C erreichten die Pflanzenwurzeln eine ausreichende Länge um aus dem flüssigen Hoagland Medium Nährstoffe aufnehmen zu können. Die Pflanzen wurden mit den Reaktionsgefäße in Aussparungen in Falcondeckeln gesteckt und die Falcons mit modifiziertem Hoagland Medium befüllt. Die *Arabidopsis* Pflanzen wuchsen weiter im Klimaschrank unter Kurztagbedingungen. Die Luftfeuchte wurde dabei jedoch auf 60 %



reduziert. Nach einer Woche wurde das Medium erneuert. Bei Erreichen einer angemessenen Größe konnte der Schwermetallstress gestartet und über 1 Woche beibehalten werden. In diesen späten Stadien wurde das Medium 2-mal pro Woche gewechselt. In diesem System kann die Wachstumszunahme kontinuierlich über die Vergrößerung der Blattoberfläche gemessen werden. Dafür wurden die Pflanzen an mehreren Zeitpunkten während der Metallbehandlung fotografiert.

Kultivierung von Pflanzen in 1.5 l fassenden Pflanztöpfen anstelle der 50 ml fassenden Falcons erlaubte die Untersuchung von älteren/größeren Pflanzen, welche über 3 Wochen mit Schwermetallen gestresst wurden.

### 2.4.4. Pflanzenanzucht in 6-well Platten

Fünf sterile Samen wurden in jede Vertiefung einer 6-well Platte gelegt, welche mit 5 ml Medium (1/10 Hoagland, LPP Medium, 1/2 MS Medium) gefüllt waren. Nach 48-stündiger Stratifikation wurden die Samen in den Langtag transferiert, wo sie bei 90 rpm geschwenkt wurden. Die Keimlinge entwickelten sich daraufhin für 7 oder 9 Tage. Um ausreichende Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen auch über den längeren Zeitraum von 9 Tagen zu gewährleisten, wurde an Tag 6 und Tag 8 das Medium gewechselt.

## **2.5. Allgemeine Mikrobiologische Methoden**

Die Auftrennung von DNA und RNA Fragmenten erfolgte über (1 %ige) Agarosegele, welche mit 0.005 % Ethidiumbromid gefärbt waren. Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* oder *A. tumefaciens* Zellen erfolgte mit dem Promega Plasmid-Extraktions-Kit nach dessen Protokoll. Ebenso wurde für die Aufreinigung von PCR-Reaktionen oder der Gelextraktion von DNA Fragmenten ein Promega Kit verwendet und nach dem entsprechenden Protokoll verfahren. Restriktionen von DNA mit Endonukleasen (Thermo Fischer, ehemals Fermentas) erfolgte nach Herstellerangaben.

Im Folgenden werden Methoden des allgemeinen mikrobiologischen Arbeitens näher erläutert.

### 2.5.1. gDNA Isolation

200 mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und zermahlen. 1 ml Extraktionspuffer (100mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA pH8, 500mM NaCl, 1.5%SDS, 0.5%  $\beta$ -Mercaptoethanol) wurde zugegeben und das Gemisch 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300  $\mu$ l „5 M“ Kalium-Acetat (3M Kalimacetat, 11.5% Eisessig, pH 4.8) wonach der Extrakt 1 h auf Eis inkubieren muss. Bei 15000 rpm und 4°C wurden anschließend die Zelltrümmer in einer Eppendorf Tischzentrifuge (5415R) für 10 min präzipitiert. 800  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 800  $\mu$ l Phenol/Chlorophorm/Isopropanol versetzt und durch invertieren gemischt. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 15000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5424) für 5 min trennten sich 2 Phasen voneinander. Die Obere wurde abgenommen und zur Fällung der DNA mit 500  $\mu$ l Isopropanol gemischt. Um die Fällungsreaktion komplett ablaufen zu lassen wurde die DNA für 30 min bis 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde sie pelletiert (5min, 15000rpm, Eppendorf 5424), mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA Pellet konnte anschließend in 20-50  $\mu$ l Wasser gelöst werden. Die gDNA wurde bei 4°C gelagert.

### 2.5.2. gDNA Isolation – Quick Prep Methode

200mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, zermahlen und mit 500  $\mu$ l Extraktionspuffer (200mM Tris/HCl pH 7.5, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS) versetzt. Nach 5 min Zentrifugation (15000rpm, Eppendorf 5424) wurden 300  $\mu$ l Überstand abgenommen und mit 300  $\mu$ l Isopropanol versetzt. Die Mischung wurde 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (5min, 15000rpm, Eppendorf 5424). Das entstandene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu$ l Wasser gelöst. Dafür wurde das Pellet bei 60°C für 5 min inkubiert und anschließend 1 h oder über Nacht bei 4°C gelagert. Nach Zentrifugation (1min, 15000rpm, Eppendorf 5424) konnten 45  $\mu$ l gelöste gDNA abgenommen und bei 4°C gelagert werden.

### 2.5.3. gDNA Isolation – CTAB Methode, Fragmentierung und Markierung

Für die Hybridisierung genomischer DNA auf einen ATH1 Microarray (siehe 2.8. *Bulk Segregant A*) wurde diese mittels der CTAB Methode nach Borevitz *et al.*, 2009 [221] isoliert.

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und gemörser. 4 g Frischgewicht wurden mit 30 ml CTAB Puffer versetzt. Nach Inkubation für 20 min bei 65°C wurden 12 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) zugegeben und die Proben für 20 min bei RT inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm (Eppendorf: F34-6-38) wurde die wässrige Phase abgenommen und mit demselben Volumen Isopropanol versetzt. Für 30 min wurden die Nukleinsäuren auf Eis präzipitiert und durch Zentrifugation bei 12000 rpm bei 4°C für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 6 ml Wasser resuspendiert und 6 ml 4 M LiAc wurde zugegeben. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die präzipitierte RNA bei 9500 rpm für 11 min pelletiert. Die DNA im Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert und 2 vol Ethanol (100%) wurden zugegeben. Das entstandene Präzipitat wurde bei 12000 rpm für 20 min pelletiert und das Pellet anschließend in 1.35ml Wasser resuspendiert. 150 µl 3 M NaAc wurden zugegeben und jede Probe auf 2 2ml Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt. 1 vol PCI wurde zugegeben und die wässrige Phase nach Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf: F45-24-11) für 5 min mit 2 vol Ethanol versetzt (100%). Durch Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Nukleotide präzipitiert und durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 300 µl Wasser resuspendiert. Die DNA Konzentration und Reinheit wurde mittels Nanophotometer gemessen. Um die verbliebene RNA zu entfernen, wurde ein Verdau mit RNase durchgeführt. Dafür wurden den Proben (240-440 µg DNA) 10 U RNase (Roth) zugegeben und sie wurden bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 3 M NaAc zugegeben, gefolgt von 1 vol PCI. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min wurde die wässrige Phase mit 2 vol Ethanol (100%) versetzt und die präzipitierten Nukleotide erneut bei 14000 rpm für 5 min pelletiert. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 200 µl Wasser resuspendiert und die DNA Konzentration und Reinheit mittels Nanophotometer ermittelt.

### Fragmentierung:

20 µg der isolierten gDNA wurden mit  $\frac{1}{6}$  U DNase (Fermentas) für 4min bei 37°C fragmentiert. Der Reaktion wurden 1.5 mM CoCl<sub>2</sub> zugegeben. Die DNase wurde anschließend bei 100°C für 15 min inaktiviert. Die Fragmentierung wurde mittel 3 % (w/v) Nusiv Agarosegel, sowie durch Vermessung mit dem Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) überprüft. Es wurden Fragmente zwischen 25 - 30 bp erzeugt.

### Markierung (*Labeling*):

Dem 3'-Ende der DNA Fragmente wurde ein Biotin-Tag angefügt. Dafür wurde der fragmentierten DNA 40U terminale Deoxynukletidyltransferase (Promega) und 2 µl von 1 mM Bio-N<sup>6</sup>-ddATP (Enzo Life Sciences) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 37°C im Dunkeln durchgeführt.

#### 2.5.4. PCR Reaktionen

Für eine PCR Reaktion wurden 50 – 200 ng Matrize eingesetzt. Es wurden verschiedene Enzyme zur Amplifikation des PCR Fragmentes verwendet. Eine selbst hergestellte Taq Polymerase diente der Amplifikation kürzerer Fragmente im Hochdurchsatz, die Taq Polymerase der Firma Thermo Fischer Scientific wurde für die Amplifikation von zu sequenzierenden Fragmenten eingesetzt und das *Proof-Reading* Enzym Phusion von Finnzymes – Thermo Fischer Scientific für die Amplifikation von zu klonierenden Bereichen. Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes (50µl):

-5 µl 10xReaktionspuffer (für Taq Polymerase: 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) TritonX-100, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) bzw. 10 µl 5xReaktionspuffer (für Phusion DNA Polymerase: siehe Thermo Fischer Scientific)

-1 µl 20 mM dNTP Mix (Thermo Fischer Scientific),

-1 µl 20 µM spezifische Oligonukleotide (vgl. 1.1. Wachstumsmedien )

(-0.8 µl DMSO)

-1 µl Taq/ 0.5 µl Phusion

Die Reaktionen wurden in einer BioRad PCR Maschine (iCycler) durchgeführt. Amplifikationsprogramm:

<u>95°C</u>	<u>2 min</u>	
95°C	30 sek	
Tm -3°C (Taq)/ +3°C (Phusion)	40 sek	10x
<u>72°C</u>	<u>60 sek/kb (Taq)/ 30 sek/kb (Phusion)</u>	
95°C	30 sek	
Tm -4°C (Taq)/ +4°C (Phusion)	40 sek	30x
<u>72°C</u>	<u>60 sek/kb (Taq)/ 30 sek/kb (Phusion)</u>	
72°C	3 min	
14°C	∞	

### 2.5.5. PCR Aufreinigung

Neben der Verwendung des Promega Kits für PCR Aufreinigung und Gelextraktionen (Methode siehe Promega Handbuch) wurde die PCR Aufreinigung wie folgt durchgeführt. Zu dem PCR Produkt wurde (1/10 des Volumens) 3 M Kaliumacetat und (3faches Volumen) eiskalter 100 %iger Ethanol zugegeben. Anschließend wurde die DNA über Nacht bei -80°C gefällt und am nächsten Tag abzentrifugiert (15min, 14000rpm, Eppendorf 5810R, 4°C). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließen getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert.

### 2.5.6. Klonierungen

Für die Klonierung der genomischen Fragmente zur Komplementation des Zn oder Cd Phänotyps von Ler-0 bzw. Col-0 wurden die Kandidatengene (ermittelt durch das QTL Mapping und weiterer Eingrenzungen) mit flankierenden genomischen Regionen aus Cvi-0 oder Bur-0 amplifiziert, den PCR Fragmenten wurde durch eine Taq Behandlung ein A-Überhang angefügt und das TOPO Klonierungssystem von Invitrogen wurde verwendet, um das Fragment in den Vektor pCR8 zu ligieren. Die Durchführung der Reaktion erfolgte wie im Handbuch zum pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit beschrieben. Die Selektion von pCR8-Zielgen positiven *E. coli* Kolonien erfolgte durch Spectinomycin. Im Anschluss an die Bestätigung der Sequenz des PCR Fragmentes durch Sequenzierung erfolgte die Rekombination mit dem Zielvektor pMDC123, einem Gateway™ Vektor [264], nach dem Gateway™ Handbuch von Invitrogen. Transformierte Zellen wurden durch das Antibiotikum Kanamycin selektiert. Durch Restriktion mit spezifischen Enzymen wurde der Zielvektor anschließend überprüft.

Für die Analyse von At1G23040 wurde das Gen N-terminal mit GFP fusioniert. Dafür wurde ein cDNA Fragment von 435 bp amplifiziert und eine um 84 bp verkürzte Version, welche nicht mehr für den GPI Anker codiert. Es wurden 4 Konstrukte durch Restriktion der PCR Fragmente mit *PacI* und *Ascl*, und anschließender Ligation mit dem (mit *PacI* und *Ascl*) linearisierten Vektor pMDC43 [264] erstellt. Zwei verkürzte Versionen des Gens und zwei Vollständige, jeweils aus den Ökotypen Ler-0 und Cvi-0, konnten demnach ubiquitär in *A. thaliana* und *N. tabacum* überexprimiert werden.

#### 2.5.7. *E. coli* und *A. tumefaciens* Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen des Stammes DH10B verwendet. 3 µl des Ligations- oder Rekombinationsansatzes wurden zu frisch aufgetauten Zellen gegeben und diese für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec. Nach erneutem Abkühlen auf Eis für 2 min wurden 500 µl LB Medium ohne Antibiotika zu den Zellen gegeben und diese für 1 h bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Nach dieser Vorinkubation erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf Antibiotika enthaltendem Medium und die Inkubation über Nacht.

*A. tumefaciens* wurde transformiert, indem 1 µg DNA zu den frisch aufgetauten Zellen gegeben wurde, und diese anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefrostet wurden. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert und dann mit 1 ml LB versetzt und für 4 h bei 28°C geschüttelt. In Anschluss daran erfolgte die Selektion der transformierten Zellen auf Kanamycin, Rifampicin und Gentamicin für 2 Tage bei 28°C.

#### 2.5.8. *A. thaliana* Transformation

*A. thaliana* wurde mittels der „Floral-Dip“ Methode transformiert. Dafür wurden die Infloreszenzen von Pflanzen in eine Suspension aus Agrobakterien, transformiert mit dem Zielvektor, Zucker und Silwet-L77 (Detergenz) getaucht.

Aus einer 2 ml Übernachtskultur von *A. tumefaciens* wurden 30 ml Medium angeimpft und bei 28°C bis zum Abend inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt haben die Bakterien eine ausreichende Dichte erreicht und mit 30 ml konnte eine neue Übernachtskultur von 400 ml angeimpft werden. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 10 min bei 3000 rpm (Sorvall) zentrifugiert und das Pellet in 500 µl 5% Saccharoselösung mit 100 µl Silwet-L77 gelöst.

Die Bakterien schleusen das Plasmid in die sich entwickelnden Samen, in welchen es in die genomische DNA integriert wird. Dafür wurde in dem Zeitraum (24h) nach dem Benetzen der Blüten mit der Bakteriensuspension die Umgebungsluftfeuchte so hoch wie möglich, und die Pflanzen im Dunkeln gehalten.

Die erfolgreiche Transformation mit dem Zielvektor pMDC123 wurde durch das Besprühen der Keimlinge mit dem Pflanzenschutzmittel BASTA getestet. Transgene Pflanzen entwickeln eine Resistenz gegenüber dem Herbizid und überleben das Besprühen, während Pflanzen, die sich aus Samen entwickeln, welche das Plasmid nicht in ihr Genom integriert haben, keine Resistenz besitzen und nicht überleben.

### 2.5.9. *N. tabacum* Transformation

Die Infiltration von Blättern von 4-6 Wochen alten Tabak Pflanzen erfolgte durch Injektion einer *A. tumefaciens* Suspension, OD = 1, des GV3101 Stammes, inklusive des gewünschten Plasmides, in einer Pufferlösung (10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MES, 10µM Acetoseringon), in welcher die Bakterien zuvor 2 h bei RT inkubiert wurden.

Expressionsanalysen via *Western Blot* bzw. Mikroskopie wurden 2 Tage nach der Infiltration vorgenommen.

### 2.5.10. RNA Isolation

100 – 200mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, zermahlen und mit 1 ml *Trizol*® versetzt. Nach einminütigem, intensivem Mischen erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT) für 5min woran sich ein erneutes Mischen (1 min) anschloss. 200 µl Chloroform wurden zugegeben und das Reaktionsgefäß für 20 sek geschüttelt. Nachdem der Extrakt für 5 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (15min, 15000rpm, Eppendorf 5415R, 4°C) wurde, konnte eine Trennung zweier Phasen beobachtet werden. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin gelöste RNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach dem Mischen und einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert (10min, 15000rpm, Eppendorf 5415R, 4°C) und das gebildete Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet im Anschluss an den Waschschrift trocknen konnte, wurde es in 20 µl RNase freiem Wasser, bei 50°C gelöst und dann bei -80°C gelagert.

### 2.5.11. cDNA Synthese mit Fermentas

Zunächst erfolgte eine DNase Behandlung der isolierten RNA (siehe 2.5.10. RNA Isolation) wobei 1 µg RNA in einem Volumen von 8 µl mit 1 µl Reaktionspuffer (10x; mit MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl DNase I versetzt wurde. Die Reaktion erfolgte für 15 min bei 37°C, bevor sie durch die Zugabe von 1 µl EDTA mit einer Konzentration von 25 mM und einer Inkubation für 10 min bei 65°C abgestoppt wurde. Im Anschluss erfolgte die eigentliche cDNA Synthese. Dafür wurden die 11 µl RNA mit 1 µl Oligo(dT) versetzt, für 5min auf 70°C aufgeheizt und für 1 min auf Eis gekühlt. 7 µl eines vorbereiteten Mastermixes (4µl 5xRT Puffer; 1µl *RiboLock Ribonukleaseinhibitor*; 2µl 10mM dNTPs) wurden zugegeben und die Reaktion für 5min bei 37°C durchgeführt. Nach anschließender Zugabe von 1 µl *RevertAid Reverse Transkriptase*

erfolgte die Synthese der cDNA für 60 min bei 42°C bevor die Reaktion für 10 min bei 70°C abgestoppt wurde. Die cDNA wurde bei 4°C gelagert.

### 2.5.12. quantitative Real Time PCR

Die *quantitative real-time* PCR (q RT-PCR) wurde in einem Bio-Rad iCycler mit einem MyiQ *real-time* Detektionssystem in 96-well Platten durchgeführt. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff war *SYBR Green* (*iQ SYBR Green supermix*, Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com>). Zu 10 µl *SYBR Green* Mix wurden 5 µl einer 1:50 verdünnten cDNA und 5 pmol *forward* und *reverse* Primer gegeben. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl. Die Primer, vgl. 2.4.14, wurden mit Hilfe des Programms *MFold* (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>) auf die Bildung von Sekundärstrukturen hin untersucht. In einem Standardprogramm von 95°C für 10min, gefolgt von 40 Zyklen von 95°C für 10 sec, und 60°C für 60 sec wurde die Amplifikation verfolgt und mittels des Programms *iQ5 Optical System* Version 2.1 (BioRad) ausgewertet. Der  $\Delta CT$  wurde errechnet, indem der *cycle threshold* (CT) des Referenzgens EF1 $\alpha$  von CT des zu analysierenden Gens subtrahiert wurde. Das *relative transcript level* (RTL) wurde mit Hilfe des  $\Delta CT$  nach folgender Formel ermittelt:  $RTL = 1000 * 2^{-\Delta CT}$ .

### 2.5.13. RT-PCR

Für eine Qualitative Aussage über die Expression eines Gens wurde eine *Relative Transcript* (RT) - PCR durchgeführt. Dies diente zum Nachweis eines Gen *knock-outs*. Dabei wurde 1µl cDNA pro Reaktion eingesetzt und ein 300 bp langes, genspezifisches Fragment amplifiziert. Vergleichend wurde eine Kontrollreaktion mit Tub durchgeführt, um die Gesamtmenge an cDNA in jeder Reaktion abschätzen zu können.

### 2.5.14. Primer

Primer wurden mithilfe des Programms *FastPCR* Version 5.2.4 designed (Anhang Tab. 1). Als Quelle für die Referenzsequenzen diente die 1001 *genomes* Datenbank [185].



## 2.6. Erdexperimente

Zunächst wurde mineralische Erde für das Experiment vorbereitet. Sie wurde getrocknet (40°C für 24-48 h), organische Bestandteile und größere Steine wurden herausgelesen, gesiebt (0.5 mm Maschengröße) und mit Schwermetallen versetzt. Dafür wurden 500 mg Erde mit 200 mg (niedrig Zink) oder 3200 mg (hoch Zink) gelöst in 500 ml Wasser versetzt und nach dem ersten intensivem Mischen für 1 h auf einem Erdmischer (Relax 20, Heidolph) vermischt. Anschließend wurde die Erde erneut bei 40°C für 48 h getrocknet und dann gesiebt (10 mm Maschengröße). Die feinkörnige Erde wurde zu 1/3 mit Sand versetzt und Portionen von je 60g in kleine schwarze Pflanztopfchen (5x5 cm große und 6 cm hoch) gefüllt. 1 Tag vor der geplanten Bepflanzung wurde jedes Topfchen mit 5 ml Wasser gegossen und am Tag der Bepflanzung die nun gleichmäßig feuchte Erde in den Topfchen mit einem Spatel aufgelockert.

*Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden für 10 Tage auf Kontroll- Agar- Platten (wie unter Abschnitt 2.4.2. Pflanzen Wachstumstest auf festem Medium beschrieben) vorgekeimt. Am 10. Tag wurden sie in die Erdtöpfe eingepflanzt. Anschließend wurde das Wachstum über 4 Wochen hinweg, wöchentlich dokumentiert. Die Kultivierung erfolgte dabei in Klimaschränken (*Percival Intellus environmental controler*, Typ AR-66L3, CLF Plant Climatics) unter Kontrolle der Tageslänge (Kurztagbedingungen: 8 h Licht, 16 h Dunkelheit), der Temperatur (22°C Tag, 18°C Nacht) und der rel. Luftfeuchte (80 %). Zudem wurden die Versuchspflanzen mit einer Reihe von Nicht-Versuchspflanzen in Substrat- Anzuchterde umgeben. Damit wurde gewährleistet, dass sich eine mögliche größere Austrocknung der Randpflanzen sowie andere Positionsbedingte Effekte nicht auf die Versuchspflanzen auswirken können. Die Versuchspflanzen wurden für die Dauer des Wachstums randomisiert.

Die Auswertung der Blattfläche erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop CS2* (Version 9.0). Die Blattfläche wurde über die Auszählung der Pixel gleicher Farbe, welche mit Hilfe des „Zauberstab“ Werkzeuges bei einer Glättung von 32 und einer Aktivierung der Funktionen „Benachbart“ und „Glätten“ markiert wurden, ermittelt. Die Topfform (5x5 cm) wurde dabei als bildinterner Standard verwendet. Zu späteren Stadien konnten Blattüberlappungen die Vermessung der Blattfläche verfälschen. Dies wurde manuell korrigiert und überlappende Bereiche 2fach vermessen.

## 2.7. Microarray

Um Expressionsunterschiede zwischen Bur-0 und Col-0 als Antwort auf Cd-Stress zu erfassen, wurden Pflanzen im Falconsystem (2.4.3. Pflanzen Wachstumstest in Flüssigmedium - das Falconsystem) angezogen und für 1 Woche mit 1µM Cadmiumchlorid gestresst. Nach Ernte der Blätter wurde die RNA, wie unter 2.5.10. RNA Isolation beschrieben, isoliert. Anschließend wurde die Reinheit der RNA durch Verwendung des RNeasy Kits von Qiagen verbessert. Die Konzentration wurde anschließend über das Nanophotometer (Implen) und ein Abschätzungsgel bestimmt. Aus der RNA wurde aRNA mit Hilfe des Affymetrix GeneChip®3`IVT Express Kits synthetisiert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Die Hybridisierung erfolgte an der Universitätsklinik Halle-Saale mit einem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 und es wurden .cel Dateien mit der Affymetrix *GeneChip Operating Software (GCOS)* erstellt. Rohdaten werden künftig auf der *Gene Expression Omnibus database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) verfügbar sein. Die .cel Dateien wurden mit dem Programm R Vers. 3.12.0 unter Verwendung des *Bioconductor Packages* [265] eingelesen und bearbeitet (siehe 2.13. Statistische Analysen). Die Normalisierung erfolgte mit der *Robust Multi-chip Average (RMA)* Methode. Es wurden zwei biologische Replikate ausgewertet. Die Korrelation der Hybridisierung der biologischen Replikate wurde von den RMA normalisierten Werten ( $R^2$ ) überprüft. Es zeigte sich eine enge Korrelation der Signale von biologischen Replikaten, während Signale von unterschiedlicher Behandlung oder unterschiedlichen Ökotypen weniger stark korrelierten. Differentiell exprimierte Gene wurden definiert als diejenigen, deren Expression im Vergleich zwischen zwei Gruppen mindestens 2fach verändert war. So wurden Gruppen von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen definiert (Z.B. beide, durch Cd-Stress, stark induziert in beiden Ökotypen.) Für die Analyse der biologischen Funktion innerhalb einer Gruppe wurde die Funktion „*GOHyperGAll*“ verwendet, welche die „*genes-to-GO*“ Karte von TAIR [266], heruntergeladen im Januar 2013, nutzt, um nach über- oder unterrepräsentierten GO Kategorien zu suchen.

## **2.8. Bulk Segregant Analysis (BSA)**

gDNA wurde nach der CTAB Methode (2.5.3. gDNA Isolation – CTAB Methode, Fragmentierung und Markierung) aus 2 Pflanzenpools mit je 30 Individuen isoliert, welche unter 700  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$  selektiert worden waren. Ein Pool enthielt dabei tolerante, ein Pool intolerante F2 Individuen einer Kreuzung von Col-0 und Mwg-3. Nach der Isolation, Fragmentierung und Labeling der DNA, erfolgte die Hybridisierung auf eine ATH1 Chip. Die Hybridisierung erfolgte an der Universitätsklinik Halle-Saale mit einem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 und es wurden .cel Dateien mit der Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) erstellt. Die .cel Dateien wurden mit Hilfe des Programms R ausgewertet. Nach einer MAS5 Normalisierung der Daten wurde der Quotient der Signale des toleranten und des intoleranten Pools für jedes Gen gebildet. Eine Abweichung von 1 stellt einen Unterschied in der Hybridisierungseffizienz für das jeweilige Gen in den beiden Pools dar. Um Falschpositive Ergebnisse zu minimieren, wurde die Kurve geglättet, indem der Mittelwert des Quotienten für jedes Gen aus den Quotienten der 100 umliegenden Gene gebildet wurde. Die Analyse wurde zu Testzwecken mit .cel Dateien von Borevitz *et al.* 2005 [267] durchgeführt.

## **2.9. Proteinbiochemische Methoden**

### 2.9.1. Isolation

*E. coli* BL21AI, welche zur Produktion von AtPCS1 das Plasmid pJC40-AtPCS1 enthielten, wurden mit Arabinose induziert und das Protein für 4h bei 21°C und 90 rpm produziert. Die Bakterien wurden pelletiert (4°C, 20 min, 18386 g, Sorvall RC-5B) und das Pellet aus 500 ml Bakterienkultur wurde mit 20 ml Wasser gewaschen (4°C, 10 min, 18500 g, Eppendorf F-34-6-38). Pro Gramm Nassgewicht wurden 3 ml Lysispuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 300 mM  $\text{NaCl}_2$ ; 20 mM Imidazol) zugegeben und 1 mg/ml Lysozym. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen sonifiziert. Dabei wurde alterniert zwischen 10 sec Ultraschallbehandlung und 10 sec Inkubation auf Eis, was 6-mal wiederholt wurde. Nach anschließender Trennung der löslichen Proteine von den Zelltrümmern (4°C, 25 min, 18500 g, Eppendorf F-34-6-38) wurde 1 ml Ni-NTA (Quiagen) zu 4 ml Proteinsuspension gegeben. Beides zusammen rotierte für 1 h bei 4°C. Anschließend wurde das Säulenmaterial samt daran gebundenem Protein in die Säule umgefüllt und die wässrige Phase heraus gepresst. Die Säule wurde 2-mal mit 4 ml Waschlösung (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM  $\text{NaCl}_2$ , 10 mM Imidazol) gewaschen und das Protein

anschließend mit mindesten 4 Elutionsschritten mit jeweils 1 ml Elutionspuffer (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM  $\text{NaCl}$ , 250 mM Imidazol) eluiert.

### 2.9.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels Pierce BCA Kit (Thermo Fischer) bestimmt. Dafür wurden pro *well* einer 96-*well* Platte 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung (in geeigneter Verdünnung) vorgelegt und dazu 90  $\mu\text{l}$  der BCA-Mischung (Lösung A und B, 50:1) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde die Absorption der Lösung bei 562 nm bestimmt (Elisa Reader PowerWave X 340, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, U.S.). Neben der zu bestimmenden Proteinlösung wurde ein *Bovine Albumine Serum* (BSA) Lösung in 5 verschiedenen Konzentrationen vermessen und als Eichgerade verwendet. Jede Messung wurde dabei als Triplikat ausgeführt.

### 2.9.3. SDS Gel

Proteine wurden mittels SDS Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Dafür wurde ein 12%iges Trenngel (365 mM Tris pH 8.8, 12% Acrylamid, 0.1% SDS, 0.2% APS, 0.08% TEMED) und ein 5%iges Sammelgel (187.5 mM Tris pH 6.8, 5% Acrylamid, 0.1% SDS, 0.6% APS, 0.3% TEMED) gegossen. Ca. 40  $\mu\text{g}$  Proteinmaterial aus Pflanzen und 20  $\mu\text{g}$  aus Bakterien wurde aufgetragen. Die Trennung erfolgte nach vorheriger Sammlung für 30 min mit 10 mA, für ca. 90 min bei 20 mA. Als Laufmittel wurde ein SDS-Puffer (2 M Glycin, 0.25 M Tris, 1% SDS) verwendet.

### 2.9.4. Proteinaktivitätstest

Zum Test der PCS Aktivität wurden zu 0.347  $\mu\text{g}$  heterolog exprimiertem Protein in 20  $\mu\text{l}$  Puffer (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300mM  $\text{NaCl}$ , 250mM Imidazol, pH 7.0 50% v/v Glycerol), 80 $\mu\text{l}$  Aktivitätspuffer (50mM HEPES pH 7.0, 12.5mM GSH, 10% v/v Glycerol) gegeben. Anschließend wurde das Enzym durch die Zugabe von Cd oder Pb aktiviert. Nach 30min Reaktion bei 35°C wurde das Enzym durch Zugabe von 1.1 $\mu\text{l}$  10%(v/v) TFA inaktiviert.

## 2.10. PC Quantifizierungen

Phytochelatine wurden aus Pflanzen extrahiert oder *in vitro* unter Verbrauch von GSH mit Hilfe der Phytochelatinsynthase (PCS) produziert. Nach dem Labeln der Moleküle konnten diese mittels zweier Messmethoden nachgewiesen werden. Aus Pflanzen extrahierte PCs wurden mittels *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry* (LC-MS) gemessen, *in vitro* produzierte mittels *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC).

### 2.10.1. via HPLC

Die während des Proteinaktivitätstests produzierten PCs wurden mit dem Farbstoff Monobrombiman (MBrB) derivatisiert. Dafür wurden zu 25 µl Reaktionsprodukt 36 µl Derivatisierungslösung (200mM EPPS Puffer mit 6.3mM DTPA pH 9.2) und 4 µl MBrB (50mM in Acetonitril) gegeben und die Derivatisierung für 30 min bei 37°C durchgeführt [82].

Für die Messung wurden 5 µl in eine HPLC (X-LCTM Jasco, Reprosil 100 C18, 5 µm Partikelgröße, 250 mm Länge, 4.6 mm Innendurchmesser) injiziert. Die Säule wurde über einen linearen, binären Gradienten mit den Lösungsmitteln Wasser (A) und 95 % (v/v) Acetonitril (B) und einer Flussrate von 1 ml/min entwickelt. Beide Lösungsmittel waren mit 0,1 %TFA angesäuert. Der Gradient begann mit der Äquilibration bei 12 % von Lösung B, gefolgt von einer Zunahme der Konzentration von Lösung B über 9 min bis auf 25 %. Über die nächsten 4 min wurde die Konzentration auf 35 % und dann für 3.5 min auf 90 % erhöht, um schließlich, über 2 min, zu den initialen Konditionen zurückzukehren, gefolgt von einer 10 min re- Äquilibration. Die Temperatur der Säule lag bei 40°C. MBrB derivatisierte Thiole wurden mit einem Fluoreszenzdetektor (FP-2020<sub>plus</sub> Jasco, Anregungswellenlänge: 280 nm, Emissionswellenlänge: 480 nm) erfasst. Für die Quantifizierung von PC2 bis PC5 wurden Standards (AnaSpec) entsprechend der Thiole (s.o.) derivatisiert und in den Endkonzentrationen 25, 50, 100 und 200 µM vermessen.

### 2.10.2. via LC-MS

Aufgrund einer höheren Sensitivität wurden Phytochelatine aus Pflanzenmaterial mittels *Ultra performance electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry* (UPLC-ESI-QTOF-MS) vermessen. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und mit 6.3mM DTPA und 0.1% TFA (300µl/100mg Pflanzenmaterial) extrahiert. Der

Extraktionspuffer enthielt außerdem 40.04  $\mu\text{M}$  N-Acetylcystein als internen Standard. Zum derivatisieren der Probe wurden 62.5  $\mu\text{l}$  des Extraktes mit 154  $\mu\text{l}$  Puffer (200mM EPPS mit 6.3mM DTPA, pH 8.2) versetzt und 6.25  $\mu\text{l}$  TCEP (20mM in 200mM ETTS, pH 8.2, gelagert bei 4°C, frisch eingewogen) zugegeben. Anschließend wurde die Probe für 10min bei 45°C reduziert und dann durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  MBrB (50 mM in Acetonitril, gelagert bei -20°C) für 30min bei 45°C derivatisiert. Zum abstoppen der Reaktion wurden 50  $\mu\text{l}$  MSA zugegeben. Die Reduktion und das Labeln der Proben entspricht dem Vorgehen von Minocha *et al.* [268].

Ein UPLC System der Firma Waters (HSS T3 Säule, 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm, Waters Corporation, Milford, MA) wurde für die Detektion verwendet. Das Injektionsvolumen entsprach 5  $\mu\text{l}$ . Die Säule wurde mit einem 15 minütigem linearem, binären Gradient von Wasser (A) und Acetonitril (B), beide angesäuert mit 0.1 % Methansäure, mit einer Flussrate von 0.5 ml/min, bei 99.5 % A und 0.5 % B, entwickelt, gefolgt von einem linearem Gradient auf 60.5 % B über 10 min, gefolgt von einem Gradient auf 99.5 % B über 12 min, gefolgt vom Spülen mit 99.5 % B für 1 min. Die Säulen-Temperatur lag bei 40°C. Die Thiole wurden mit einem *Q-TOF Premier mass spectrometer* Detektor, ausgerüstet mit einer ESI Quelle (Waters Corporation), angewandt im V+ Modus, detektiert. Grundlegende Parameter waren: Kapillare 0.6 kV, *sampling cone* 30 V, *extraction cone* 30 V, *ion guide* 3.3 V, Quelltemperatur 120°C, *cone* Gasfluss 10 l/h, *desolvation* Gasfluss 1000 l/h, Kollisionsenergie 4.0 V. Datenerfassung erfolgte in einem Masse/Ladungs-Bereich von : m/z 300-2000, einer *scan* Zeit von 0.3 sec und einem *inter-scan delay* von 0.05 sec. Für die Quantifizierung wurde das Modul *QuanLynx* des *MarkerLynx* Programms verwendet. Die Integration der rekonstruierten Ionenspur der protonierten Ionen bei m/z:  $354.1 \pm 0.5$  bei  $39 \pm 0.3$  min (MBrB-N-Acetylcystein, Interner Standard) und m/z  $920.3 \pm 0.5$  bei  $4.57 \pm 0.3$  min (MBrB-PC2, Analyt) wurden durchgeführt um PC2 zu quantifizieren. Eine lineare Kalibration (durch den Ursprung) mit den Konzentrationen 125, 250, 500 nM und 2.5  $\mu\text{M}$ , wurde verwendet. Die Messung erfolgte mit zwei technischen Replikaten.

### **2.11. Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry (ICP-OES)**

Für die Analyse von Metallgehalten wurden ICP Messungen mit einer ICP-OES 6500 Serie (Thermo) durchgeführt. Für die verschiedenen Metalle wurden folgende Wellenlängen für

die Quantifizierung verwendet. Pb: 220.3 nm, Zn: 213.8 nm, Fe: 238.2 nm, Mn: 257.6nm, Cd: 226.5 nm, Co: 228.6 nm, Mo: 202 nm und Ni: 231.6 nm

### 2.11.1. Vermessung von Lösungen

Medien wurden für die Messung von Präzipitaten durch Zentrifugation (30 min, RT, 18000g) befreit, mit HNO<sub>3</sub> verdünnt als auch angesäuert und vermessen.

### 2.11.2. Vermessung von Pflanzenproben

Hydroponisch gewonnenes Wurzelmaterial wurde gewaschen (10 min in Wasser, 10 min in 0.1 M CaCl<sub>2</sub>, 10 min in 10 mM EDTA pH 8, 10 min in Wasser, 4°C, Inkubation auf Rotator) um der Wurzel anhaftende Metalle zu entfernen. Blattmaterial aus Erdexperimenten wurde ebenfalls gewaschen (1mal in lauwarmem Wasser) um Erdpartikel zu entfernen. Die Proben wurden anschließend für 2 d lyophilisiert und im trocknen Zustand gewogen.

Der Aufschluss erfolgte in einem geschlossenen Verfahren. Dem Pflanzenmaterial wurden 4 ml HNO<sub>3</sub> und 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben. Anschließend wurde es in einer Mikrowelle (StarT von MLS Mikrowellen Laborsystem) ausgestattet mit einem ColorTerminal 640ct, für 12 min auf 180°C erhitzt. Die Lösung wurde mit 2 % (v/v) HNO<sub>3</sub> verdünnt.

## **2.12. Mikroskopie und Färbungen**

Keimlingswurzeln wurden nach 6 Tagen Wachstum in 6-well Platten in flüssigem 1/10 Hoagland Medium bei einem pH von 5.7 bzw. 5.0 und bei AlCl<sub>3</sub> Konzentrationen von 0 – 40 µM für 30 sec in 1:1000fach mit Wasser verdünntem Propidiumiodid (PI) gefärbt und anschließend für 1 min in Wasser gewaschen und innerhalb 1 h mikroskopiert. Für die Mikroskopie wurde ein Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mit Fluoreszenzlampe zur Anregung des Farbstoffes bei 535 nm verwendet. Die Emission von DNA gebundenem PI bei 617 nm konnte so dokumentiert werden. Für die Quantifizierung der Stressintensität wurden gefärbte Zellen/ Kerne ausgezählt.

Für die Detektion der subzellularen Lokalisation von GFP-At1G2304 wurden Tabakblattdiscs, in welchen das Transgen transient exprimiert wurde mittels konfokalem Lasermikroskop (Leica Confocal Microscope TCS SP5 und zugehörige Leica Software) untersucht. Das GFP

wurde mit dem Argonlaser (458-514 nm) angeregt. Die Laserintensität lag bei 5%, Pinhole und Photomultiplier wurden für eine optimale Signalstärke angepasst.

### 2.13. Statistische Analysen

Statistik von Wachstumsexperimenten, Metallakkumulationen, PC Bildung und ähnlichem wurde mit dem Programm SigmaPlot Vers. 11 berechnet. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen Gruppen wurden dabei einwege- (ein Vergleichsfaktor) bzw. zweiwege- (zwei Faktoren definieren die Gruppe) Varianzanalysen durchgeführt. Die Validierung der Varianzanalyse erfolgte mittels Tukey Test. Wurden relative Werte verglichen, so wurden diese „*arcsin square root*“ transformiert um sie zu normalisieren. Waren zu analysierenden Datensatz Werte größer als 1, so wurden alle Werte vor der Transformierung halbiert. Signifikante Unterschiede wurden festgestellt bei einem  $p < 0.05$  (\*). Ab einem  $p < 0.01$  konnten \*\* vergeben werden und für ein  $p < 0.001$ : \*\*\*. Wurden mehr als zwei Ökotypen miteinander verglichen, so wurden signifikante Unterschiede zu dem Referenzökotyp Col-0 angegeben, oder Gruppen definiert, welche sich signifikant (d.h.  $p < 0.05$ ) voneinander unterschieden. Dafür wurden Ökotypen, welche einer Gruppe angehörten, mit demselben Kleinbuchstaben gekennzeichnet und unterschiedliche Gruppen mit einem anderen Buchstaben.

Statistische Analysen der Microarraydaten wurden mit dem Programm R Version 2.13.0 mit *Bioconductor packages* [265] durchgeführt. Außerdem wurden GO Anreicherungsanalysen mit MapMan Vers. 3.6.0.RC1 in einem Fisher Test mit Bonferroni Korrektur validiert.



## **Literaturverzeichnis**

1. Fischer S, Kühnlenz T, Thieme M, Schmidt H, Clemens S: Analysis of Plant Pb Tolerance at Realistic Submicromolar Concentrations Demonstrates the Role of Phytochelatin Synthesis for Pb Detoxification. *Environ Sci Technol* 2014, 48:7552–7559.
2. Emsley J: *Nature's Building Blocks. An A - Z Guide to the Elements*. Oxford: Oxford University Press; 2001.
3. Lehninger AL: ROLE OF METAL IONS IN ENZYME SYSTEMS. *Am Physiol soc* 1950, 30:393–429.
4. Berg JM: Metal Ions in Proteins: Structural and Functional Roles. *Cold Spring Harb Sym* 1987, 52:579–585.
5. White PJ, Broadley MR: Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 2009, 182:49–84.
6. Baynes RD, Bothwell TH: Iron Deficiency. *Annu Rev Nutr* 1990, 10:133–148.
7. Prasad AS: Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr* 1991, 53:403–412.
8. Walker CF, Black RE: Zinc and the Risk for Infectious Disease. *Annu Rev Nutr* 2004, 24:255–275.
9. Uruguchi S, Kamiya T, Clemens S, Fujiwara T: Characterization of OsLCT1, a cadmium transporter from indica rice (*Oryza sativa*). *Physiol Plantarum* 2014, 151:339–347.
10. Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang CF, Ando T, Yano M, Ma JF: Gene limiting cadmium accumulation in rice. *P Natl Acad Sci USA* 2010, 107:16500–16505.
11. Uruguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyojuka J, Ishikawa S, Fujiwara T: Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *P Natl Acad Sci USA* 2011, 108:20959–20964.
12. Satoh-Nagasawa N, Mori M, Nakazawa N, Kawamoto T, Nagato Y, Sakurai K, Takahashi H, Watanabe A, Akagi H: Mutations in Rice (*Oryza sativa*) Heavy Metal ATPase 2 (OsHMA2) Restrict the Translocation of Zinc and Cadmium. *Plant Cell Physiol* 2012, 53:213–224.
13. Wang L, Xu Y, Sun Y, Liang X, Lin D: Identification of pakchoi cultivars with low cadmium accumulation and soil factors that affect their cadmium uptake and translocation. *Front Environ Sci Eng* 2014:1–11.
14. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA: The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol* 2006, 1:22.

15. Ortblad KF, Lozano R, Murray CJL: The burden of HIV: insights from the Global Burden of Disease Study 2010. *AIDS* 2013, 27:2003–2017.
16. Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S, Ahmad A: Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J Environ Biol* 2009, 30:165–174.
17. Smith DS, Bell RA, Kramer JR: Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comp Biochem Phys C* 2002, 133:65–74.
18. Karlsson T, Persson P, Skyllberg U: Extended X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy Evidence for the Complexation of Cadmium by Reduced Sulfur Groups in Natural Organic Matter. *Environ Sci Technol* 2005, 39:3048–3055.
19. Ossowski S, Schneeberger K, Clark RM, Lanz C, Warthmann N, Weigel D: Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. *Genome Res* 2008, 18:2024–2033.
20. EFSA Panel: Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal* 2009:1–139.
21. Sanità di Toppi L, Gabbriellini R: Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Botany* 1999, 41:105–130.
22. Knight B, Zhao FJ, McGrath SP, Shen ZG: Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effects on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil* 1997, 197:71–78.
23. Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N: Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci* 2013, 18:92–99.
24. Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Juul T, Petersen AH, Nielsen KL, Jørgensen J-E, Weigel D, Andersen SU: SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat Meth* 2009, 6:550–551.
25. Salt DE, Prince RC, Baker AJM, Raskin I, Pickering IJ: Zinc Ligands in the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* As Determined Using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environ Sci Technol* 1999, 33:713–717.
26. Dudev T, Lim C: Principles Governing Mg, Ca, and Zn Binding and Selectivity in Proteins. *Chem Rev* 2003, 103:773–788.
27. McCall KA, Huang C, Fierke CA: Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J Nutr* 2000, 130:1437S–1446S.
28. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM: Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* 2008, 13:1205–1218.
29. Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A: Zinc in plants. *New Phytol* 2007, 173:677–702.

30. Alloway BJ: *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. 2nd Edition. Brussels, Belgium and Paris, France; 2008.
31. Rehman H, Aziz T, Farooq M, Wakeel A, Rengel Z: Zinc nutrition in rice production systems: a review. *Plant Soil* 2012, 361:203–226.
32. Forno DA, Yoshida S, Asher CJ: Zinc deficiency in rice. *Plant Soil* 1975, 42:537–550.
33. Wissuwa M, Ismail AM, Yanagihara S: Effects of Zinc Deficiency on Rice Growth and Genetic Factors Contributing to Tolerance. *Plant Physiol* 2006, 142:731–741.
34. Boken E: Investigations on the determination of the available manganese content of soils. *Plant Soil* 1958, 9:269–285.
35. Davidson CM, Urquhart GJ, Ajmone-Marsan F, Biasioli M, da Costa Duarte A, Díaz-Barrientos E, Grčman H, Hossack I, Hursthouse AS, Madrid L, Rodrigues S, Zupan M: Fractionation of potentially toxic elements in urban soils from five European cities by means of a harmonised sequential extraction procedure. *Anal Chim Acta* 2006, 565:63–72.
36. Yocum CF, Pecoraro VL: Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese. *Curr Opin Chem Biol* 1999, 3:182–187.
37. Apel K, Hirt H: REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Ann Rev Plant Biol* 2004, 55:373–399.
38. Scandalios JG: Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol* 1993, 101:7–12.
39. Crossgrove J, Zheng W: Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed* 2004, 17:544–553.
40. Foy CD, Chaney RL, White MC: The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1978, 29:511–566.
41. Koyama H, Toda T, Hara T: Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin–Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *J Exp Bot* 2001, 52:361–368.
42. Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M: Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *P Natl Acad Sci USA*. 2007, 104:9900–9905.
43. Kochian LV: Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annu Rev Plant Phys* 1995, 46:237–260.
44. Godbold DL, Hüttermann A: The uptake and toxicity of mercury and lead to spruce (*Picea abies karst.*) seedlings. *Water Air Soil Poll* 1986, 31:509–515.
45. Kopittke PM, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW: Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *J Exp Bot* 2010, 61:945–954.

46. Nriagu JO: A History of Global Metal Pollution. *Science* 1996, 272:223–223.
47. Nriagu JO: Tales Told in Lead. *Science* 1998, 281:1622–1623.
48. Lee S-Z, Chang L, Yang H-H, Chen C-M, Liu M-C: Adsorption characteristics of lead onto soils. *J Haz Mat* 1998, 63:37–49.
49. EFSA Panel: EFSA - Scientific Opinion of the CONTAM Panel: Lead in Food. *EFSA Journal* 2010, 8:1570–1717.
50. Parker DR, Norvell WA: Advances in Solution Culture Methods for Plant Mineral Nutrition Research. *Adv Agron* 1999, 65:151–213.
51. McLaughlin M., Parker D., Clarke J.: Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Res* 1999, 60:143–163.
52. Martínez C., Motto H.: Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ Pollut* 2000, 107:153–158.
53. Kopittke PM, Asher CJ, Menzies NW: Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions. *Environ Pollut* 2008, 153:548–554.
54. Tang X-Y, Zhu Y-G, Chen S-B, Tang L-L, Chen X-P: Assessment of the effectiveness of different phosphorus fertilizers to remediate Pb-contaminated soil using in vitro test. *Environ Int* 2004, 30:531–537.
55. Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML: A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *P Natl Acad Sci USA* 1996, 93:5624–5628.
56. Korshunova, Yulia O.: The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* , 40:37–44.
57. Clemens S: Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 2006, 88:1707–1719.
58. Guerinot ML: The ZIP family of metal transporters. *Bioch Biophys Acta - Biomem* 2000, 1465:190–198.
59. Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML: Expression of the IRT1 Metal Transporter Is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation. *Plant Cell* 2002, 14:1347–1357.
60. Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat J-F, Curie C: IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth. *Plant Cell* 2002, 14:1223–1233.
61. Lanquar V, Lelievre F, Bolte S, Hames C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schroder A, Kramer U, Barbier-Brygoo H, Thomine S: Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *Eur Mol Biol Org J* 2005, 24:4041–4051.

62. Liu XF, Culotta VC: Post-translation Control of Nramp Metal Transport in Yeast ROLE OF METAL IONS AND THE BSD2 GENE. *J Biol Chem* 1999, 274:4863–4868.
63. Song W-Y, Martinoia E, Lee J, Kim D, Kim D-Y, Vogt E, Shim D, Choi KS, Hwang I, Lee Y: A Novel Family of Cys-Rich Membrane Proteins Mediates Cadmium Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2004, 135:1027–1039.
64. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N: A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *P Natl Acad Sci USA*. 1996, 93:5105–5110.
65. Cailliatte R, Schikora A, Briat J-F, Mari S, Curie C: High-Affinity Manganese Uptake by the Metal Transporter NRAMP1 Is Essential for Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions. *Plant Cell* 2010, 22:904–917.
66. Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arai T, Nakanishi H, Nishizawa NK: Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport. *Sci Rep* 2012, 2.
67. Yang M, Zhang Y, Zhang L, Hu J, Zhang X, Lu K, Dong H, Wang D, Zhao F-J, Huang C-F, Lian X: OsNRAMP5 contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots. *J Exp Bot* 2014:eru259.
68. Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, Nishizawa NK: OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice. *Plant Signal Behav* 2012, 7:763–766.
69. Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF: Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice[C][W]. *Plant Cell* 2012, 24:2155–2167.
70. Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannona D: Divalent Metal Transporter 1 in Lead and Cadmium Transport. *Ann NY Acad Sci* 2004, 1012:142–152.
71. Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D: Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *P Natl Acad Sci USA*. 1998, 95:7220–7224.
72. Clemens S: Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 2001, 212:475–486.
73. Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC: Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J Biol Chem* 1987, 262:16333–16337.
74. Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C: Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 2002, 32:539–548.
75. Williams LE, Pittman JK, Hall J.: Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Bioch Bioph Acta - Biomem* 2000, 1465:104–126.

76. Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, Wagner GJ: Expression of Arabidopsis CAX2 in Tobacco. Altered Metal Accumulation and Increased Manganese Tolerance. *Plant Phys* 2000, 124:125–134.
77. Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H: A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J* 1999, 20:171–182.
78. Clemens S: Evolution and function of phytochelatins. *J Plant Phys* 2006, 163:319–332.
79. Grill E, Winnacker EL, Zenk MH: Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 1985, 230:674–676.
80. Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS: Cadmium-Sensitive, cad1 Mutants of Arabidopsis thaliana Are Phytochelatins Deficient. *Plant Physiol* 1995, 107:1059–1066.
81. Ha S-B, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS: Phytochelatins Synthase Genes from Arabidopsis and the Yeast Schizosaccharomyces pombe. *Plant Cell* 1999, 11:1153–1163.
82. Tennstedt P, Peisker D, Böttcher C, Trampczynska A, Clemens S: Phytochelatins Synthesis Is Essential for the Detoxification of Excess Zinc and Contributes Significantly to the Accumulation of Zinc. *Plant Physiol* 2009, 149:938–948.
83. Kühnlenz T, Schmidt H, Uraguchi S, Clemens S: Arabidopsis thaliana phytochelatins synthase 2 is constitutively active in vivo and can rescue the growth defect of the PCS1-deficient cad1-3 mutant on Cd-contaminated soil. *J Exp Bot* 2014:eru195.
84. Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH: Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *P Natl Acad Sci USA*. 1987, 84:439–443.
85. Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette M-LM, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou J-P, Vavasseur A, Leonhardt N: Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* 2006, 88:1751–1765.
86. Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ: Plant metallothioneins. *Biochem J* 1993, 295(Pt 1):1–10.
87. Hamer DH: Metallothionein1,2. *Ann Rev Biochem* 1986, 55:913–951.
88. Mendoza-Cózatl DG, Jobe TO, Hauser F, Schroeder JI: Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr Opin Plant Biol* 2011, 14:554–562.
89. Cobbett C, Goldsbrough P: Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 2002, 53:159–182.

90. Rauser WE: Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem Biophys* 1999, 31:19–48.
91. O'Halloran TV, Culotta VC: Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *J Biol Chem* 2000, 275:25057–25060.
92. Axelsen KB, Palmgren MG: Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2001, 126:696–706.
93. Chao D-Y, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE: Genome-Wide Association Studies Identify Heavy Metal ATPase3 as the Primary Determinant of Natural Variation in Leaf Cadmium in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 2012, 8:e1002923.
94. Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P: AtHMA3, a P1B-ATPase Allowing Cd/Zn/Co/Pb Vacuolar Storage in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2009, 149:894–904.
95. Ueno D, Milner MJ, Yamaji N, Yokosho K, Koyama E, Clemencia Zambrano M, Kaskie M, Ebbs S, Kochian LV, Ma JF: Elevated expression of TcHMA3 plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of Thlaspi caerulescens. *Plant J* 2011, 66:852–862.
96. Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW: Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Europ Mol Biol Org J* 1992, 11:3491–3499.
97. Sánchez-Fernández R, Davies TGE, Coleman JOD, Rea PA: The Arabidopsis thaliana ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. *J Biol Chem* 2001, 276:30231–30244.
98. Song W-Y, Park J, Mendoza-Cozatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hortensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, Schroeder JI, Lee Y, Martinoia E: Arsenic tolerance in Arabidopsis is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *P Natl Acad Sci USA* 2010, 107:21187–21192.
99. Song W-Y, Mendoza-Cózatl DG, Lee Y, Schroeder JI, Ahn S-N, Lee H-S, Wicker T, Martinoia E: Phytochelatin–metal(loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 2014, 37:1192–1201.
100. Mendoza-Cozatl DG, Zhai Z, Jobe TO, Akmajian GZ, Song W-Y, Limbo O, Russell MR, Kozlovskyy VI, Martinoia E, Vatamaniuk OK, Russell P, Schroeder JI: Tonoplast-localized Abc2 Transporter Mediates Phytochelatin Accumulation in Vacuoles and Confers Cadmium Tolerance. *J Biol Chem* 2010, 285:40416–40426.
101. Park J, Song W-Y, Ko D, Eom Y, Hansen TH, Schiller M, Lee TG, Martinoia E, Lee Y: The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J* 2012, 69:278–288.
102. Van der Zaal BJ, Neuteboom LW, Pinas JE, Chardonens AN, Schat H, Verkleij JAC, Hooykaas PJJ: Overexpression of a Novel Arabidopsis Gene Related to Putative Zinc-

Transporter Genes from Animals Can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation. *Plant Physiol* 1999, 119:1047–1056.

103. Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJM, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML: Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis. *Plant Physiol* 2001, 126:1646–1667.

104. Desbrosses-Fonrouge A-G, Voigt K, Schröder A, Arrivault S, Thomine S, Krämer U: Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Lett* 2005, 579:4165–4174.

105. Haydon MJ, Cobbett CS: A Novel Major Facilitator Superfamily Protein at the Tonoplast Influences Zinc Tolerance and Accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2007, 143:1705–1719.

106. Haydon MJ, Kawachi M, Wirtz M, Hillmer S, Hell R, Krämer U: Vacuolar Nicotianamine Has Critical and Distinct Roles under Iron Deficiency and for Zinc Sequestration in Arabidopsis. *Plant Cell* 2012, 24:724–737.

107. Rea PA, Li Z-S, Lu Y-P, Drozdowicz YM, Martinoia E: From Vacuolar Gs-X Pumps to Multispecific Abc Transporters. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 1998, 49:727–760.

108. Koren'kov V, Park S, Cheng N-H, Sreevidya C, Lachmansingh J, Morris J, Hirschi K, Wagner GJ: Enhanced Cd<sup>2+</sup>-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing Arabidopsis cation exchangers. *Planta* 2007, 225:403–411.

109. Edmond C, Shigaki T, Ewert S, Nelson MD, Connorton JM, Chalova V, Noordally Z, Pittman JK: Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity. *Biochemical J* 2009, 418:145.

110. Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H: AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 2003, 34:685–695.

111. Song W-Y, Choi KS, Kim DY, Geisler M, Park J, Vincenzetti V, Schellenberg M, Kim SH, Lim YP, Noh EW, Lee Y, Martinoia E: Arabidopsis PCR2 Is a Zinc Exporter Involved in Both Zinc Extrusion and Long-Distance Zinc Transport. *Plant Cell* 2010, 22:2237–2252.

112. Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI: The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *P Natl Acad Sci USA*. 1998, 95:12043–12048.

113. Deinlein U, Weber M, Schmidt H, Rensch S, Trampczynska A, Hansen TH, Husted S, Schjoerring JK, Talke IN, Kramer U, Clemens S: Elevated Nicotianamine Levels in Arabidopsis halleri Roots Play a Key Role in Zinc Hyperaccumulation. *Plant Cell* 2012, 24:708–723.

114. Weber M, Deinlein U, Fischer S, Rogowski M, Geimer S, Tenhaken R, Clemens S: A mutation in the Arabidopsis thaliana cell wall biosynthesis gene pectin methylesterase 3 as



well as its aberrant expression cause hypersensitivity specifically to Zn. *Plant J* 2013, 76:151–164.

115. Howden R, Cobbett CS: Cadmium-Sensitive Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1992, 100:100–107.

116. Reimann C, Flem B, Fabian K, Birke M, Ladenberger A, Négrel P, Demetriades A, Hoogewerff J: Lead and lead isotopes in agricultural soils of Europe – The continental perspective. *Appl Geochem* 2012, 27:532–542.

117. Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D: Naturally Occurring Genetic Variation in *Arabidopsis Thaliana*. *Ann Rev Plant Biol* 2004, 55:141–172.

118. Weigel D, Mott R: The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 2009, 10:107.

119. Alonso-Blanco C, El-Assal SE-D, Coupland G, Koornneef M: Analysis of Natural Allelic Variation at Flowering Time Loci in the Landsberg erecta and Cape Verde Islands Ecotypes of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 1998, 149:749–764.

120. El-Din El-Assal S, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Raz V, Koornneef M: A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet* 2001, 29:435–440.

121. Paran I, Zamir D: Quantitative traits in plants: beyond the QTL. *Trends Genet* 2003, 19:303–306.

122. Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Koornneef M, Lister C, Dean C, Van Den Bosch N, Pot J, Kuiper MTR: Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J* 1998, 14:259–271.

123. Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L, Lenstra JA: Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *J Clin Microbiol* 1999, 37:3083–3091.

124. Kobayashi Y, Kuroda K, Kimura K, Southron-Francis JL, Furuzawa A, Kimura K, Iuchi S, Kobayashi M, Taylor GJ, Koyama H: Amino Acid Polymorphisms in Strictly Conserved Domains of a P-Type ATPase HMA5 Are Involved in the Mechanism of Copper Tolerance Variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008, 148:969–980.

125. Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L: The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* 2006, 45:225–236.

126. Gravot A, Lieutaud A, Verret F, Auroy P, Vavasseur A, Richaud P: AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* 2004, 561:22–28.

127. Rus A, Baxter I, Muthukumar B, Gustin J, Lahner B, Yakubova E, Salt DE: Natural Variants of AtHKT1 Enhance Na<sup>+</sup> Accumulation in Two Wild Populations of *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 2006, 2.

128. Mäser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N, Robertson W, Sussman MR, Schroeder JI: Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. *FEBS Letters* 2002, 531:157–161.
129. Baxter I, Brazelton JN, Yu D, Huang YS, Lahner B, Yakubova E, Li Y, Bergelson J, Borevitz JO, Nordborg M, Vitek O, Salt DE: A Coastal Cline in Sodium Accumulation in Arabidopsis thaliana Is Driven by Natural Variation of the Sodium Transporter AtHKT1;1. *PLoS Genet* 2010, 6:e1001193.
130. Simonson TS, Yang Y, Huff CD, Yun H, Qin G, Witherspoon DJ, Bai Z, Lorenzo FR, Xing J, Jorde LB, Prchal JT, Ge R: Genetic Evidence for High-Altitude Adaptation in Tibet. *Science* 2010, 329:72–75.
131. McKay JK, Richards JH, Mitchell-Olds T: Genetics of drought adaptation in Arabidopsis thaliana: I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits. *Mol Ecol* 2003, 12:1137–1151.
132. Fournier-Level A, Korte A, Cooper MD, Nordborg M, Schmitt J, Wilczek AM: A Map of Local Adaptation in Arabidopsis thaliana. *Science* 2011, 334:86–89.
133. Simon M, Loudet O, Durand S, Berard A, Brunel D, Sennesal F-X, Durand-Tardif M, Pelletier G, Camilleri C: Quantitative Trait Loci Mapping in Five New Large Recombinant Inbred Line Populations of Arabidopsis thaliana Genotyped With Consensus Single-Nucleotide Polymorphism Markers. *Genetics* 2008, 178:2253–2264.
134. Burr B, Burr FA: Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends Genet* 1991, 7:55–60.
135. Kowalski SP, Lan T-H, Feldmann KA, Paterson AH: QTL mapping of naturally-occurring variation in flowering time of Arabidopsis thaliana. *Molec Gen Genet* 1994, 245:548–555.
136. Price AH: Believe it or not, QTLs are accurate!. *Trends Plant Sci* 2006, 11:213–216.
137. Spielau T: Untersuchungen der natürlichen Diversität in der Schwermetall-Aufnahme, -Verteilung und Akkumulation in Arabidopsis thaliana Ökotypen. 2009.
138. Clemens S, Persoh D: Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Sci* 2009, 177:266–271.
139. Jobe TO, Sung D-Y, Akmakjian G, Pham A, Komives EA, Mendoza-Cózatl DG, Schroeder JI: Feedback inhibition by thiols outranks glutathione depletion: a luciferase-based screen reveals glutathione-deficient γ-ECS and glutathione synthetase mutants impaired in cadmium-induced sulfate assimilation. *Plant J* 2012, 70:783–795.
140. Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, Wirén N von: Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiol* 2013, 163:161–179.
141. Van Ooijen JW: MapQTL<sup>®</sup> 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental population. 2004.

142. Ng PC, Henikoff S: SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003, 31:3812–3814.
143. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protocols* 2009, 4:1073–1081.
144. Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H: Vacuolar Sulfate Transporters Are Essential Determinants Controlling Internal Distribution of Sulfate in Arabidopsis. *Plant Cell* 2004, 16:2693–2704.
145. Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R: Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* 2005, 29:653–671.
146. Van Hoewyk D, Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits EAH: Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in Arabidopsis. *Physiol Plant* 2008, 132:236–253.
147. Fu S-F, Chen P-Y, Nguyen QTT, Huang L-Y, Zeng G-R, Huang T-L, Lin C-Y, Huang H-J: Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* 2014, 14:94.
148. Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M: mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 2004, 37:914–939.
149. Antonov AV, Schmidt T, Wang Y, Mewes HW: ProfCom: a web tool for profiling the complex functionality of gene groups identified from high-throughput data. *Nucleic Acids Res* 2008, 36:W347–W351.
150. Pan Y, Michael TP, Hudson ME, Kay SA, Chory J, Schuler MA: Cytochrome P450 Monooxygenases as Reporters for Circadian-Regulated Pathways. *Plant Physiol* 2009, 150:858–878.
151. Mortel JE van de, Villanueva LA, Schat H, Kwekkeboom J, Coughlan S, Moerland PD, Themaat EVL van, Koornneef M, Aarts MGM: Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of Arabidopsis thaliana and the Related Metal Hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. *Plant Physiol* 2006, 142:1127–1147.
152. Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye E v, Clemens S: Comparative microarray analysis of Arabidopsis thaliana and Arabidopsis halleri roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* 2004, 37:269–281.
153. Semane B, Cuypers A, Smeets K, Van Belleghem F, Horemans N, Schat H, Vangronsveld J: Cadmium responses in Arabidopsis thaliana: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol Plant* 2007, 129:519–528.

154. Masood A, Iqbal N, Khan NA: Role of ethylene in alleviation of cadmium-induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard. *Plant, Cell & Environ* 2012, 35:524–533.
155. Alonso-Blanco C, Mendez-Vigo B, Koornneef M: From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int J Dev Biol* 2005, 49:717–732.
156. Weigel D: Natural Variation in Arabidopsis: From Molecular Genetics to Ecological Genomics. *Plant Physiol* 2012, 158:2–22.
157. Pineau C, Loubet S, Lefoulon C, Chalies C, Fizames C, Lacombe B, Ferrand M, Loudet O, Berthomieu P, Richard O: Natural Variation at the FRD3 MATE Transporter Locus Reveals Cross-Talk between Fe Homeostasis and Zn Tolerance in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 2012, 8:e1003120.
158. Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Gunther T, Bender S, Fitz J, Koenig D, Lanz C, Stegle O, Lippert C, Wang X, Ott F, Muller J, Alonso-Blanco C, Borgwardt K, Schmid KJ, Weigel D: Whole-genome sequencing of multiple Arabidopsis thaliana populations. *Nat Genet* 2011, advance online publication.
159. Lee S, Moon JS, Ko T-S, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS: Overexpression of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiol* 2003, 131:656–663.
160. Mao D-D, Tian L-F, Li L-G, Chen J, Deng P-Y, Li D-P, Luan S: AtMGT7: An Arabidopsis Gene Encoding a Low-Affinity Magnesium Transporter. *J Int Plant Biol* 2008, 50:1530–1538.
161. Gebert M, Meschenmoser K, Svidova S, Weghuber J, Schweyen R, Eifler K, Lenz H, Weyand K, Knoop V: A Root-Expressed Magnesium Transporter of the MRS2/MGT Gene Family in Arabidopsis thaliana Allows for Growth in Low-Mg<sup>2+</sup> Environments. *Plant Cell* 2009, 21:4018–4030.
162. Clemens S, Bloss T, Vess C, Neumann D, Nies DH, Nieden U zur: A Transporter in the Endoplasmic Reticulum of Schizosaccharomyces pombe Cells Mediates Zinc Storage and Differentially Affects Transition Metal Tolerance. *J Biol Chem* 2002, 277:18215–18221.
163. Van De Mortel JE, Schat H, Moerland PD, Van Themaat EVL, Van Der Ent S, Blankestijn H, Ghandilyan A, Tsiatsiani S, Aarts MG m.: Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in Arabidopsis thaliana and the related Zn/Cd-hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. *Plant, Cell & Environ* 2008, 31:301–324.
164. Becher M, Talke IN, Krall L, Krämer U: Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Plant J* 2004, 37:251–268.
165. Talke IN, Hanikenne M, Krämer U: Zinc-Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional Deregulation, and Higher Gene Copy Number for Genes in Metal Homeostasis of the Hyperaccumulator Arabidopsis halleri. *Plant Phys* 2006, 142:148–167.

166. Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM: Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* 2006, 29:1532–1544.
167. Inoue H, Fukuoka D, Tatai Y, Kamachi H, Hayatsu M, Ono M, Suzuki S: Properties of lead deposits in cell walls of radish (*Raphanus sativus*) roots. *J Plant Res* 2013, 126:51–61.
168. Jonak C, Nakagami H, Hirt H: Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiol* 2004, 136:3276–3283.
169. Pfalz M, Mikkelsen MD, Bednarek P, Olsen CE, Halkier BA, Kroymann J: Metabolic Engineering in *Nicotiana benthamiana* Reveals Key Enzyme Functions in Arabidopsis Indole Glucosinolate Modification. *Plant Cell* 2011, 23:716–729.
170. Zhang X, Gou M, Liu C-J: Arabidopsis Kelch Repeat F-Box Proteins Regulate Phenylpropanoid Biosynthesis via Controlling the Turnover of Phenylalanine Ammonia-Lyase[C][W][OPEN]. *Plant Cell* 2013, 25:4994–5010.
171. Finger-Teixeira A, Lucio Ferrarese M de L, Ricardo Soares A, da Silva D, Ferrarese-Filho O: Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. *Ecotox Environ Safe* 2010, 73:1959–1964.
172. Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A: Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiol* 2001, 127:887–898.
173. Skórzyńska-Polit E, Krupa Z: Lipid Peroxidation in Cadmium-Treated *Phaseolus coccineus* Plants. *Arch Environ Contam Toxicol* 2006, 50:482–487.
174. Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM: Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Phys* 2007, 164:1346–1357.
175. Desikan R, A.-H.-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ: Regulation of the Arabidopsis Transcriptome by Oxidative Stress. *Plant Physiol* 2001, 127:159–172.
176. Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, Río LA del, Sandalio LM: Cellular Response of Pea Plants to Cadmium Toxicity: Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, and Calcium. *Plant Physiol* 2009, 150:229–243.
177. Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF: Calcium at the Crossroads of Signaling. *Plant Cell* 2002, 14(suppl 1):S401–S417.
178. Hetherington AM, Brownlee C: THE GENERATION OF Ca<sup>2+</sup> SIGNALS IN PLANTS. *Annu Rev Plant Biol* 2004, 55:401–427.
179. Chmielowska-Bak J, Gzyl J, Rucinska-Sobkowiak R, Arasimowicz-Jelonek M, Deckert J: The new insights into cadmium sensing. *Front Plant Sci* 2014, 5.

180. Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W, Dietz K-J: Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* 1997, 203:9–19.
181. Hsu YT, Kao CH: Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Environ* 2003, 26:867–874.
182. Yakhin OI, Yakhin IA, Lubyanov AA, Vakhitov VA: Effect of cadmium on the content of phytohormones and free amino acids, its cytogenetic effect, and accumulation in cultivated plants. *Dokl Biol Sci* 2009, 426:274–277.
183. Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S: Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 2009, 103:1–11.
184. Koen E, Besson-Bard A, Duc C, Astier J, Gravot A, Richaud P, Lamotte O, Boucherez J, Gaymard F, Wendehenne D: Arabidopsis thaliana nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure. *Plant Sci* 2013, 209:1–11.
185. 1001genomes.org [<http://1001genomes.org/>]
186. Obayashi T, Nishida K, Kasahara K, Kinoshita K: ATTED-II Updates: Condition-Specific Gene Coexpression to Extend Coexpression Analyses and Applications to a Broad Range of Flowering Plants. *Plant Cell Physiol* 2011, 52:213–219.
187. Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, Karthikeyan AS, Lee CH, Nelson WD, Ploetz L, Singh S, Wensel A, Huala E: The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucl Acids Res* 2011, 40:D1202–D1210.
188. Griffiths AJ, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM: An Introduction to Genetic analysis, 7<sup>th</sup> edition. W.H.Freeman; 2000.
189. Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS: Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 2012, 40:D1178–D1186.
190. Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P: Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv Bioinf* 2008, 2008:1–5.
191. Weigel World Bioinformatics Portal [<http://bioinformatics.weigelworld.org/webtools.html>]
192. McKhann HI, Camilleri C, Bérard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Le Corre V, Caloustian C, Gut IG, Brunel D: Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2004, 38:193–202.
193. Fankhauser N, Mäser P: Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinf* 2005, 21:1846–1852.

194. Eisenhaber B, Bork P, Yuan Y, Löffler G, Eisenhaber F: Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. *Trends Biochem Sci* 2000, 25:340–341.
195. Borner GH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P: Identification of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Arabidopsis. A Proteomic and Genomic Analysis. *Plant Physiol* 2003, 132:568–577.
196. Saleh AAH, El-Meleigy SA, Ebad FA, Helmy MA, Jentschke G, Godbold DL: Base cations ameliorate Zn toxicity but not Cu toxicity in sugar beet (*Beta vulgaris*). *J Plant Nutr Soil Sc* 1999, 162:275–279.
197. Baker AJM: The Uptake of Zinc and Calcium from Solution Culture by Zinc-Tolerant and Non-Tolerant *Silene Maritima* with. in Relation to Calcium Supply. *New Phytol* 1978, 81:321–330.
198. Baxter I, Muthukumar B, Park HC, Buchner P, Lahner B, Danku J, Zhao K, Lee J, Hawkesford MJ, Guerinot ML, Salt DE: Variation in Molybdenum Content Across Broadly Distributed Populations of *Arabidopsis thaliana* Is Controlled by a Mitochondrial Molybdenum Transporter (MOT1). *PLoS Genet* 2008, 4:e1000004.
199. Macquet A, Ralet M-C, Loudet O, Kronenberger J, Mouille G, Marion-Poll A, North HM: A Naturally Occurring Mutation in an *Arabidopsis* Accession Affects a  $\beta$ -D-Galactosidase That Increases the Hydrophilic Potential of Rhamnogalacturonan I in Seed Mucilage. *Plant Cell* 2007, 19:3990–4006.
200. Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette M-L, Mireau H, Peeters N, Renou J-P, Szurek B, Taconnat L, Small I: Genome-Wide Analysis of *Arabidopsis* Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *Plant Cell* 2004, 16:2089–2103.
201. Aubourg S, Boudet N, Kreis M, Lecharny A: In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol Biol* 2000, 42:603–613.
202. Schepens I, Boccalandro HE, Kami C, Casal JJ, Fankhauser C: PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE4 Modulates Phytochrome-Mediated Control of Hypocotyl Growth Orientation. *Plant Physiol* 2008, 147:661–671.
203. Fankhauser C, Yeh K-C, Clark J, Lagarias, Zhang H, Elich TD, Chory J: PKS1, a Substrate Phosphorylated by Phytochrome That Modulates Light Signaling in *Arabidopsis*. *Science* 1999, 284:1539–1541.
204. Showalter AM, Keppler BD, Lichtenberg J, Gu D, Welch LR: A Bioinformatics Approach to the Identification, Classification, and Analysis of Hydroxyproline-Rich Glycoproteins. *Plant Physiol* 2010:pp.110.156554.
205. Cassab GI: Plant Cell Wall Proteins. *Ann Rev Plant Phys* 1998, 49:281–309.
206. Jarvis M., Leung DW.: Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environ Exp Bot* 2002, 48:21–32.

207. Samardakiewicz S, Krzeslowska M, Bilski H, Bartosiewicz R, Wozny A: Is callose a barrier for lead ions entering *Lemna minor* L. root cells?. *Protoplasma* 2012, 249:347–351.
208. Malone C, Koeppe DE, Miller RJ: Localization of Lead Accumulated by Corn Plants 1. *Plant Physiol* 1974, 53:388–394.
209. Krzesłowska M: The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant* 2011, 33:35–51.
210. Hall JL: Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 2002, 53:1–11.
211. Bergonci T, Ribeiro B, Ceciliato PHO, Guerrero-Abad JC, Silva-Filho MC, Moura DS: *Arabidopsis thaliana* RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. *J Exp Bot* 2014, 65:2219–2230.
212. Yang J, Sardar HS, McGovern KR, Zhang Y, Showalter AM: A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion. *Plant J* 2007, 49:629–640.
213. Shi H, Kim Y, Guo Y, Stevenson B, Zhu J-K: The *Arabidopsis* SOS5 Locus Encodes a Putative Cell Surface Adhesion Protein and Is Required for Normal Cell Expansion. *Plant Cell* 2003, 15:19–32.
214. Zhao ZD, Tan L, Showalter AM, Lamport DTA, Kieliszewski MJ: Tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein purified from transgenic tobacco corroborates the Hyp contiguity hypothesis. *Plant J* 2002, 31:431–444.
215. Sun W, Zhao ZD, Hare MC, Kieliszewski MJ, Showalter AM: Tomato LeAGP-1 is a plasma membrane-bound, glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan-protein. *Physiol Plantarum* 2004, 120:319–327.
216. Atwell BJ, Kriedemann PE, Turnbull CGN: Plants in Action. In *Plants in Action Adaptation in Nature, Performance in Cultivation*. Macmillan Education Australia Pty Ltd, Melbourne, Australia; 1999.
217. Nationalpark Harz: Willkommen | Nationalpark Harz [<http://www.nationalpark-harz.de/>]
218. Ranftl Q: Untersuchungen zur Säuretoleranz und Wurzelexsudation im Modellsystem *Arabidopsis thaliana*. 2009.
219. Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H: STOP1 Regulates Multiple Genes That Protect *Arabidopsis* from Proton and Aluminum Toxicities. *Plant Physiol* 2009, 150:281–294.
220. Graca da Silveira M, Vitoria San Romao M, Loureiro-Dias MC, Rombouts FM, Abee T: Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microb* 2002, 68:6087–6093.



221. Borevitz JO, Liang D, Plouffe D, Chang H-S, Zhu T, Weigel D, Berry CC, Winzeler E, Chory J: Large-Scale Identification of Single-Feature Polymorphisms in Complex Genomes. *Genome Res* 2003, 13:513–523.
222. Borevitz J: Genotyping and Mapping With High-Density Oligonucleotide Arrays. In *Arabidopsis Protocols*. Edited by Salinas J, Sanchez-Serrano JJ. Humana Press; 2006:137–145.
223. Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros MA: HOW DO CROP PLANTS TOLERATE ACID SOILS? MECHANISMS OF ALUMINUM TOLERANCE AND PHOSPHOROUS EFFICIENCY. *Annu Rev Plant Biol* 2004, 55:459–493.
224. Aranzana MJ, Kim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C, Toomajian C, Traw B, Zheng H, Bergelson J, Dean C, Marjoram P, Nordborg M: Genome-Wide Association Mapping in Arabidopsis Identifies Previously Known Flowering Time and Pathogen Resistance Genes. *PLoS Genet* 2005, 1:0531-0539.
225. Liang F, Sze H: A High-Affinity Ca<sup>2+</sup> Pump, ECA1, from the Endoplasmic Reticulum Is Inhibited by Cyclopiazonic Acid but Not by Thapsigargin. *Plant Physiol* 1998, 118:817–825.
226. Wu Z, Liang F, Hong B, Young JC, Sussman MR, Harper JF, Sze H: An Endoplasmic Reticulum-Bound Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>Pump, ECA1, Supports Plant Growth and Confers Tolerance to Mn<sup>2+</sup> Stress. *Plant Physiol* 2002, 130:128 –137.
227. Long Q, Rabanal FA, Meng D, Huber CD, Farlow A, Platzer A, Zhang Q, Vilhjalmsón BJ, Korte A, Nizhynska V, Voronin V, Korte P, Sedman L, Mandakova T, Lysak MA, Seren U, Hellmann I, Nordborg M: Massive genomic variation and strong selection in Arabidopsis thaliana lines from Sweden. *Nat Genet* 2013, 45:884–890.
228. Cosson P, Decroocq V, Revers F: Development and characterization of 96 microsatellite markers suitable for QTL mapping and accession control in an Arabidopsis core collection. *Plant Methods* 2014, 10:2.
229. Gasber A, Klaumann S, Trentmann O, Trampczynska A, Clemens S, Schneider S, Sauer N, Feifer I, Bittner F, Mendel RR, Neuhaus HE: Identification of an Arabidopsis solute carrier critical for intracellular transport and inter-organ allocation of molybdate. *Plant Biol* 2011, 13:710–718.
230. Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A: Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* 2010, 105:1141–1157.
231. Thieme M: Investigations into natural variation of heavy metal tolerance in Arabidopsis thaliana. 2013.
232. Bakircioglu D, Kurtulus YB, İbar H: Comparison of Extraction Procedures for Assessing Soil Metal Bioavailability of to Wheat Grains. *CLEAN – Soil Air Water* 2011, 39:728–734.
233. Ryan P, Delhaize E, Jones D: Function and Mechanism of Organic Anion Exudation from Plant Roots. *Annu Rev Plant Phys* 2001, 52:527–560.

234. Wei Yang TJ, Perry PJ, Ciani S, Pandian S, Schmidt W: Manganese deficiency alters the patterning and development of root hairs in Arabidopsis. *J Exp Bot* 2008, 59:3453–3464.
235. Tanaka N, Kato M, Tomioka R, Kurata R, Fukao Y, Aoyama T, Maeshima M: Characteristics of a root hair-less line of Arabidopsis thaliana under physiological stresses. *J Exp Bot* 2014, 65:1497–1512.
236. Birchler JA, Auger DL, Riddle NC: In Search of the Molecular Basis of Heterosis. *Plant Cell* 2003, 15:2236–2239.
237. Hazen SP, Borevitz JO, Harmon FG, Pruneda-Paz JL, Schultz TF, Yanovsky MJ, Liljegren SJ, Ecker JR, Kay SA: Rapid Array Mapping of Circadian Clock and Developmental Mutations in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2005, 138:990–997.
238. Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoeberichts FA, Vandenabeele M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G: Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant cat2 demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Plant J* 2007, 52:640–657.
239. Hartwig A: Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights. *Biometals* 2010, 23:951–960.
240. Pålsson A-MB: Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air, & Soil Poll* 1989, 47:287–319.
241. 976. Lead WHO Food Additives Series 44  
[<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec12.htm>]
242. Wheeler D, Edmeades D: Effect of depth and lime or phosphorus-fertilizer applications on the soil solution chemistry of some New Zealand pastoral soils. *Soil Res* 1995, 33:461–476.
243. Eplatténier FL, Murase I, Martell AE: New Multidentate Ligands. VI. Chelating Tendencies of N,N'-Di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid. *J Am Chem Soc* 1967, 89:837–843.
244. Yunta F, López-Rayó S, Lucena JJ: Thermodynamic Database Update to Model Synthetic Chelating Agents in Soil Systems. *J App Sol Chem Mod* 2012:46–64.
245. Gustafsson JP: *Visual MINTEQ*. [<http://vminteq.lwr.kth.se/>]
246. Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P, Rea PA: Mechanism of Heavy Metal Ion Activation of Phytochelatin (PC) Synthase BLOCKED THIOLS ARE SUFFICIENT FOR PC SYNTHASE-CATALYZED TRANSPEPTIDATION OF GLUTATHIONE AND RELATED THIOL PEPTIDES. *J Biol Chem* 2000, 275:31451–31459.
247. Oven M, Page JE, Zenk MH, Kutchan TM: Molecular Characterization of the Homophytochelatin Synthase of Soybean Glycine max RELATION TO PHYTOCHELATIN SYNTHASE. *J Biol Chem* 2002, 277:4747–4754.

248. Weng L, Temminghoff EJM, Van Riemsdijk WH: Determination of the free ion concentration of trace metals in soil solution using a soil column Donnan membrane technique. *Europ J Soil Sci* 2001, 52:629–637.
249. Bovenkamp GL, Prange A, Schumacher W, Ham K, Smith AP, Hormes J: Lead Uptake in Diverse Plant Families: A Study Applying X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy. *Environ Sci Technol* 2013, 47:4375–4382.
250. Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T: The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatins and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol* 1996, 110:1145–1150.
251. Andra SS, Datta R, Sarkar D, Makris KC, Mullens CP, Sahi SV, Bach SBH: Synthesis of phytochelatin in vetiver grass upon lead exposure in the presence of phosphorus. *Plant Soil* 2010, 326:171–185.
252. Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A: Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 2002, 60:153–162.
253. Zhang Z, Gao X, Qiu B: Detection of phytochelatin in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* exposed to cadmium and lead. *Phytochem* 2008, 69:911–918.
254. Song W-Y, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang Y-Y, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y: Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotechnol* 2003, 21:914–919.
255. Lee J, Bae H, Jeong J, Lee J-Y, Yang Y-Y, Hwang I, Martinoia E, Lee Y: Functional Expression of a Bacterial Heavy Metal Transporter in *Arabidopsis* Enhances Resistance to and Decreases Uptake of Heavy Metals. *Plant Physiol* 2003, 133:589–596.
256. Cao S, Chen Z, Liu G, Jiang L, Yuan H, Ren G, Bian X, Jian H, Ma X: The *Arabidopsis* Ethylene-Insensitive 2 gene is required for lead resistance. *Plant Physiol Biochem* 2009, 47:308–312.
257. Kim D-Y, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y: The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 2007, 50:207–218.
258. Kim D-Y, Bovet L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E, Lee Y: AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006, 140:922–932.
259. Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H: Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 1988, 241:1086–1089.
260. Koyama H, Toda T, Yokota S, Dawair Z, Hara T: Effects of Aluminum and pH on Root Growth and Cell Viability in *Arabidopsis thaliana* Strain Landsberg in Hydroponic Culture. *Plant Cell Physiol* 1995, 36:201–205.
261. Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, Hou B-H, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S: *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *Plant Cell* 2006, 18:731–746.

262. Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y: AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2005, 138:827–836.
263. Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI: Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The Europ Mol Biol Org J* 1999, 18:3325–3333.
264. Curtis MD, Grossniklaus U: A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiol* 2003, 133:462–469.
265. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J: Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004, 5:R80.
266. The Gene Ontology [<http://geneontology.org/>]
267. Borevitz J: Supplemental Material for Arabidopsis Protocols ( <http://naturalsystems.uchicago.edu/naturalvariation/methods/>). 2005.
268. Minocha R, Thangavel P, Dhankher OP, Long S: Separation and quantification of monothiols and phytochelatin from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography. *J Chrom A* 2008, 1207:72–83.

## **Anhang**

**Anhang Abb. 1:** Sequenzierung der RIL X124

**Anhang Abb. 2:** Graphische Darstellung des Expressionsverhaltens von At1G23040

**Anhang Abb. 3:** Expression von At1G23040 nach (A) Hormonbehandlung, (B) Abiotischem Stress, (C) Lichtbehandlung und (D) biotischem Stress

**Anhang Abb. 4:** Zn-Toleranz der At1G23040 T-DNA Insertionslinien

**Anhang Abb. 5:** Metalltoleranz von Mwg-3

**Anhang Abb. 6:** Phänotyp von Mwg-3

**Anhang Abb. 7:** Metallakkumulation von Mwg-3

**Anhang Abb. 8:** Metallakkumulation in den Samen von Mwg-3

**Anhang Abb. 9:** Darstellung der Al-Toleranz von Mwg-3 durch Mikroskopie

**Anhang Abb. 10:** Sequenzierung zum Nachweis genotypischer Unterschiede zwischen Mwg-3 und Hovdala-2

**Anhang Tab. 1:** Liste der verwendeten Primer

Angegeben sind die Sequenzen der Primer, ihre Lage im *A. thaliana* Genom, ev. enthaltene Restriktionsschnittstellen sowie eine Beschreibung für ihre Funktion

**Anhang Tab. 2:** Darstellung des Expressionsverhaltens

der Gene in Haupt- und Nebencluster. Die Mittlere Signalintensität wurde errechnet als MW der Genexpression aller Gene des Clusters. Diese Werte sind Grundlage für die schematische Darstellung des Expressionsverhaltens in Tab. 9.

**Anhang Tab. 3:** Gene aus Cluster Analyse in Abbildung 29,

welche in einem Abstand von 2 cM zum höchsten LOD Wert zu finden sind.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehme werde.

---

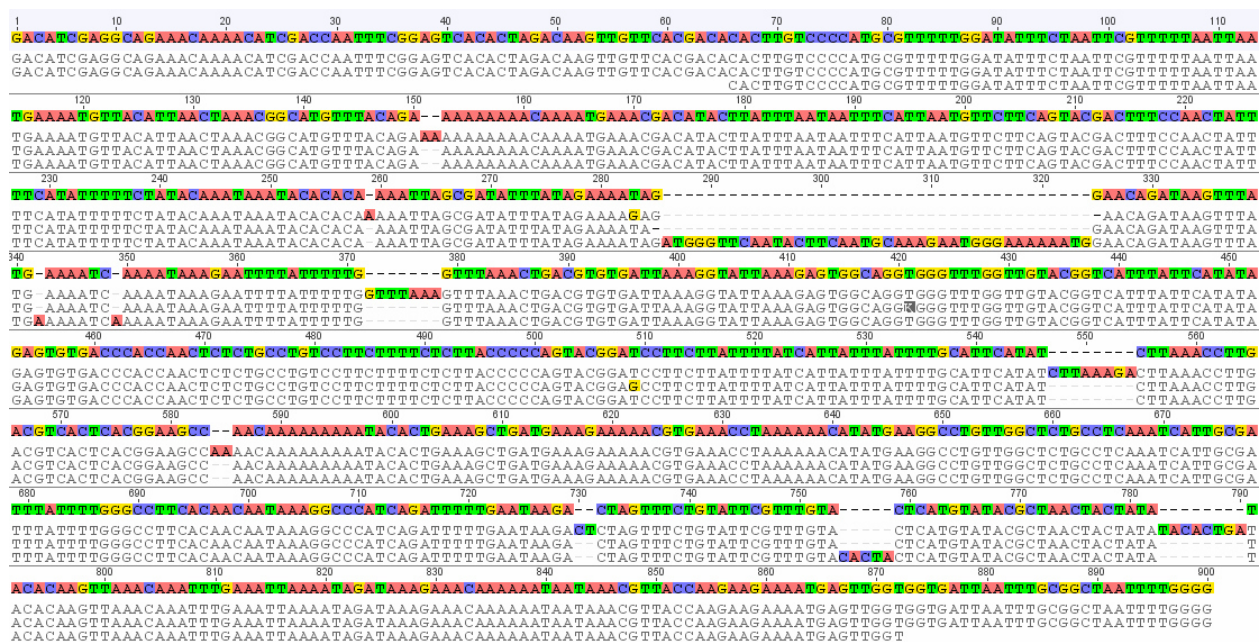
Bayreuth, 29.09.2014, Sina Fischer

# Anhang Abbildung 1

A

Konsensus  
Cvi-0  
Ler-0  
X124

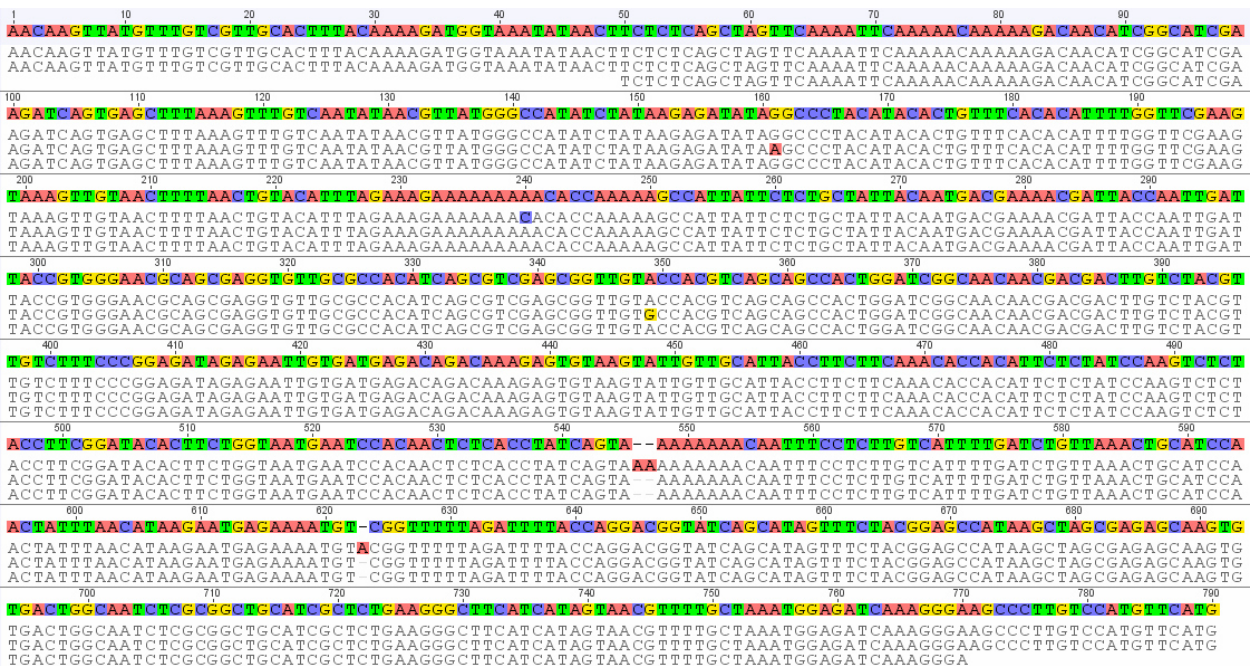
gen. Region um Position 5646330 auf Chr. 1



B

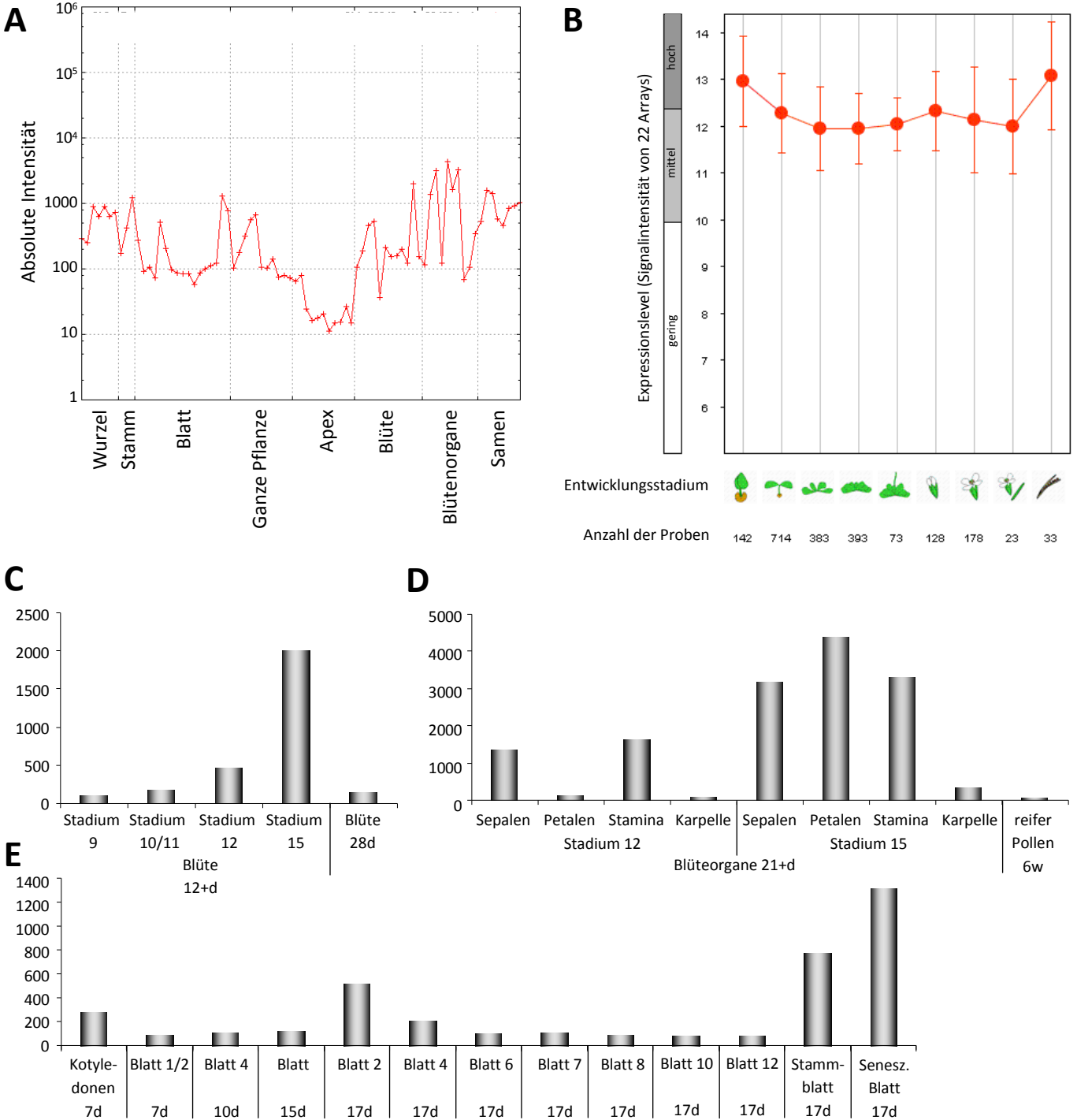
Konsensus  
Cvi-0  
Ler-0  
X124

gen. Region um Position 6278745 auf Chr. 1



Sequenzierung der RIL X124 in der Region von 6278751 bp bis 6279540 bp zur Bestätigung der CAPS Markeranalyse an der Position 6278745 bp und zur Erfassung des Genotyps von Position 5646334 bp bis 5647200 bp auf Chromosom 1. Das Alignment der Referenzsequenzen Cvi-0 und Ler-0 (1001 genomes [179]) mit der sequenzierten Region erfolgte mit dem Programm Geneious Version 7.1.4

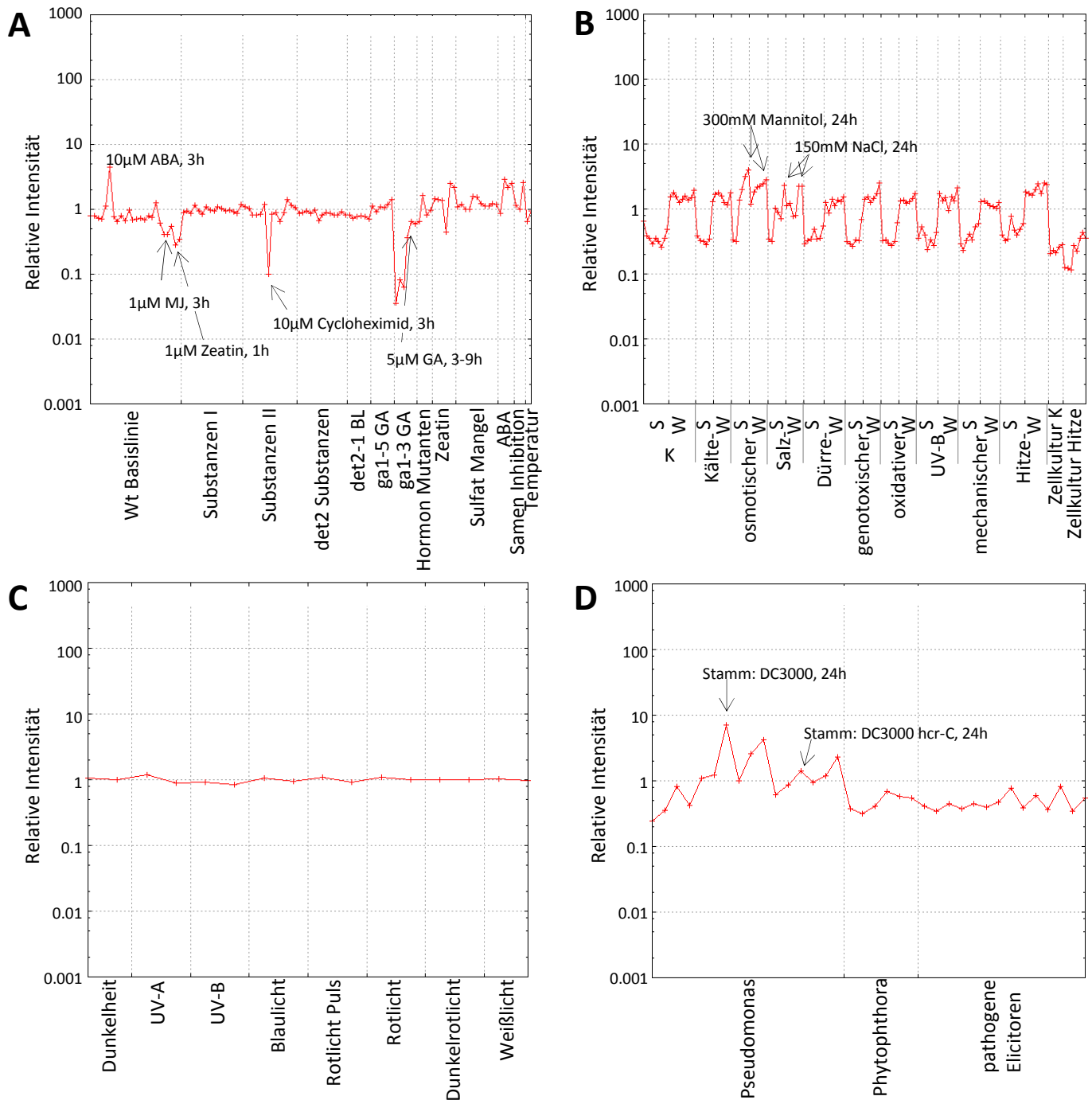
## Anhang Abbildung 2



Graphische Darstellung des Expressionsverhaltens von At1G23040 in Bezug auf **(A)** die Gewebetypen **[182]** oder **(B)** den Entwicklungsstand von *A. thaliana* nach Genevestigator **[194]**. **(C-E)** zeigt die Expression von At1G23040 in verschiedenen Geweben in welche ein Expressionsverhalten abhängig vom Entwicklungsstadium beobachtet werden kann (Daten verändert nach Schmid *et al.* 2005 **[182]**. d = Tage nach Keimung).

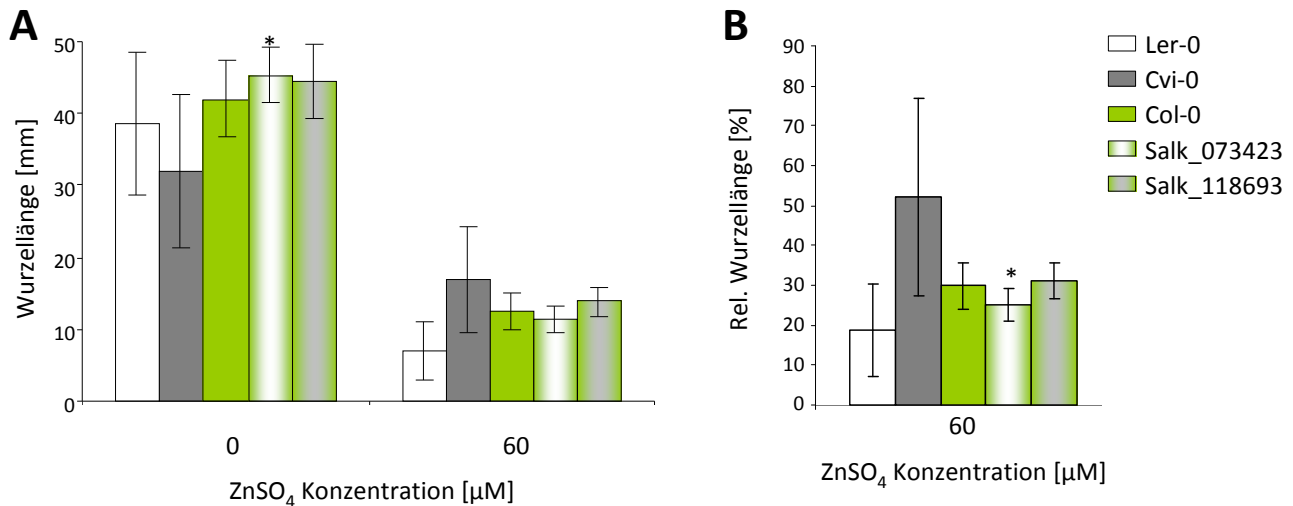


## Anhang Abbildung 3



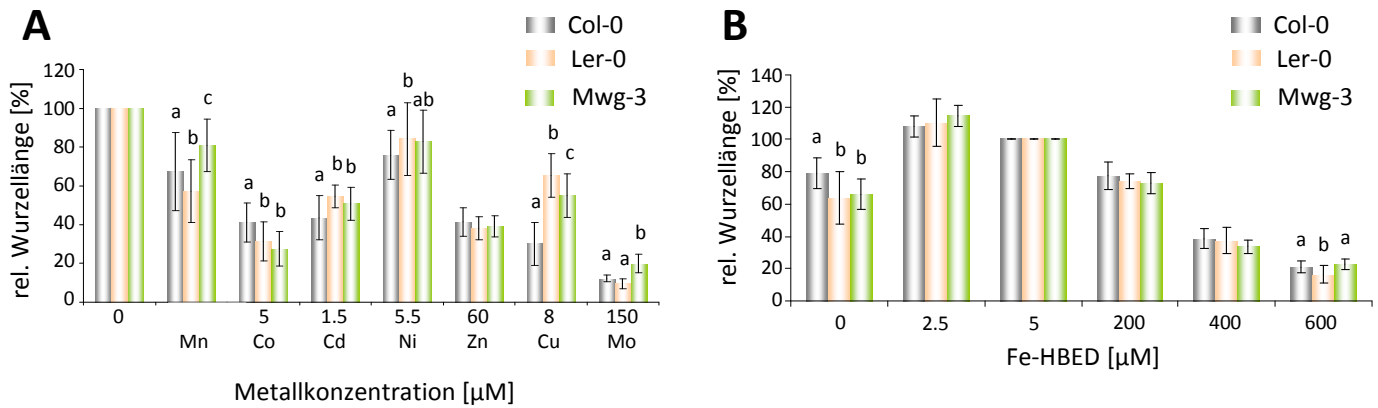
Expression von At1G23040 nach **(A)** Hormonbehandlung, **(B)** Abiotischem Stress, **(C)** Lichtbehandlung und **(D)** biotischem Stress (Graphiken erstellt nach *AtGeneExpress Visualization Tool* [182]). Angegeben ist die Expression nach Behandlung mit diversen Induktoren. Die Kontrolle ist jeweils vor der entsprechenden Behandlung aufgetragen. Unterschiedliche Experimente, mit unterschiedlichen Induktoren sind durch vertikale Linien voneinander getrennt. Für **(B)** gilt: S: Spross; W: Wurzel; ...-stress. Bei Substanzen I und II handelt es sich um verschiedene Inhibitoren der Hormonsynthese oder des Hormon Transportes. Signifikante (d.h. mehr als halbfache) Induktion oder Reprimierung der Expression von At1G23040 erfolgt durch Behandlung mit ABA: Abszisinsäure, MJ: Metyl-Jasmonat, Zeatin, Cycloheximid, GA: Gibberelinsäure oder Phytophthorabehandlung.

## Anhang Abbildung 4



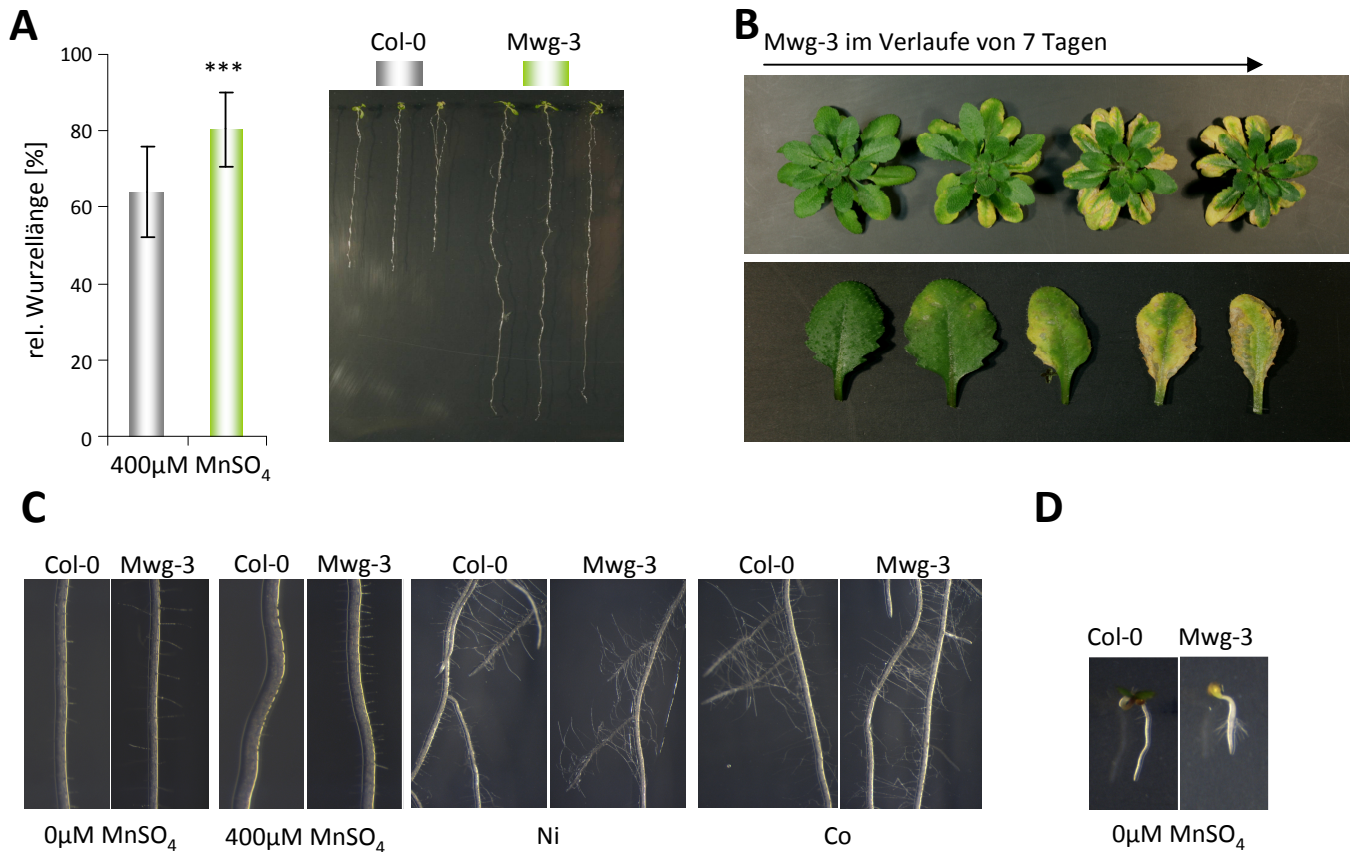
Zn-Toleranz der At1G23040 T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum WT Col-0. Das Wachstum der Ökotypen Cvi-0 und Ler-0 ist als Referenz mit angegeben. **(A)** Absolute Wurzellängen nach 7-tägigem Wachstum im Flüssigsystem unter Kontrollbedingungen und nach Zn-Stress. **(B)** Relative Wurzellängen in Referenz zum mittleren Wachstum unter Kontrollbedingungen des jeweiligen Experimentes. Dargestellt sind in A und B MW  $\pm$  SD aus 1 unabhängigen Experimenten mit n = 14-16 für Col-0 und die Insertionslinien für welche signifikante Unterschiede mittels zweiwege-Varianzanalyse und Tukey Test ermittelt wurden: \*: p<0.05. Als Referenz sind MW aus 6 unabhängigen Experimenten dargestellt für Ler-0 und Cvi-0 mit n = 73-86.

## Anhang Abbildung 5



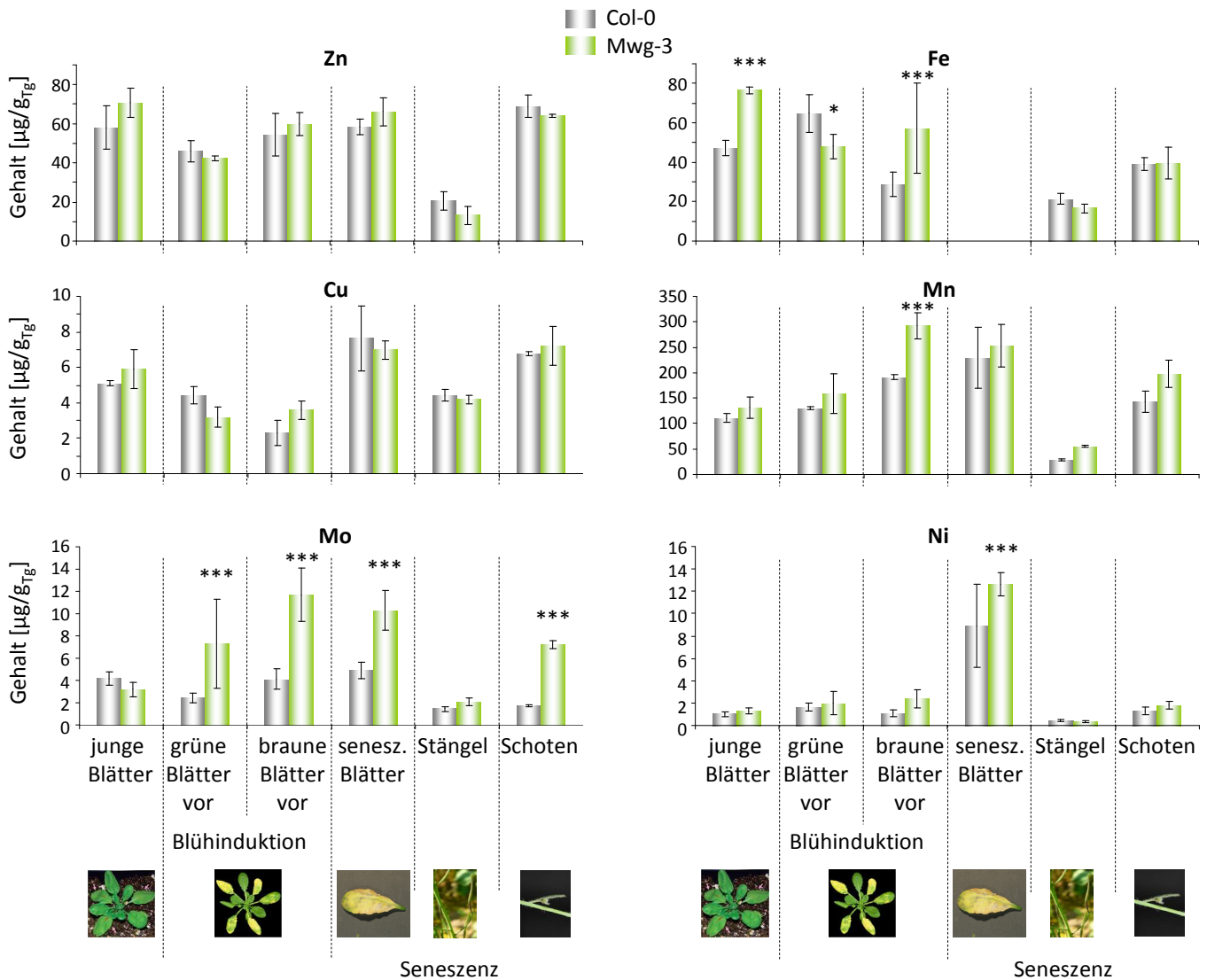
Metalltoleranz von Mwg-3 im Vergleich mit anderen Ökotypen von *A. thaliana*. **(A)** Dargestellt sind mittlere relative Wurzellängen  $\pm$  SD im Verhältnis zum Wachstum unter Kontrollbedingungen ohne Zusatz von Schwermetallen. **(B)** Relatives Wurzelwachstum unter Eisenmangel (0 und 2.5  $\mu\text{M}$ ), unter Kontrollbedingungen (5  $\mu\text{M}$ ) und unter Eisenstress (200-400  $\mu\text{M}$ ) der drei Ökotypen. Signifikante Unterschiede zwischen der Toleranz der Ökotypen in A-B wurden mittels Zweifache-Varianzanalyse und Tukey Test erhoben. Unterschiedliche Buchstaben symbolisieren signifikante ( $p < 0.05$ ,  $n = 9-55$ ) Unterschiede in der Toleranz. Daten erhoben von A. Trampczynska 2009, unveröffentlicht.

## Anhang Abbildung 6



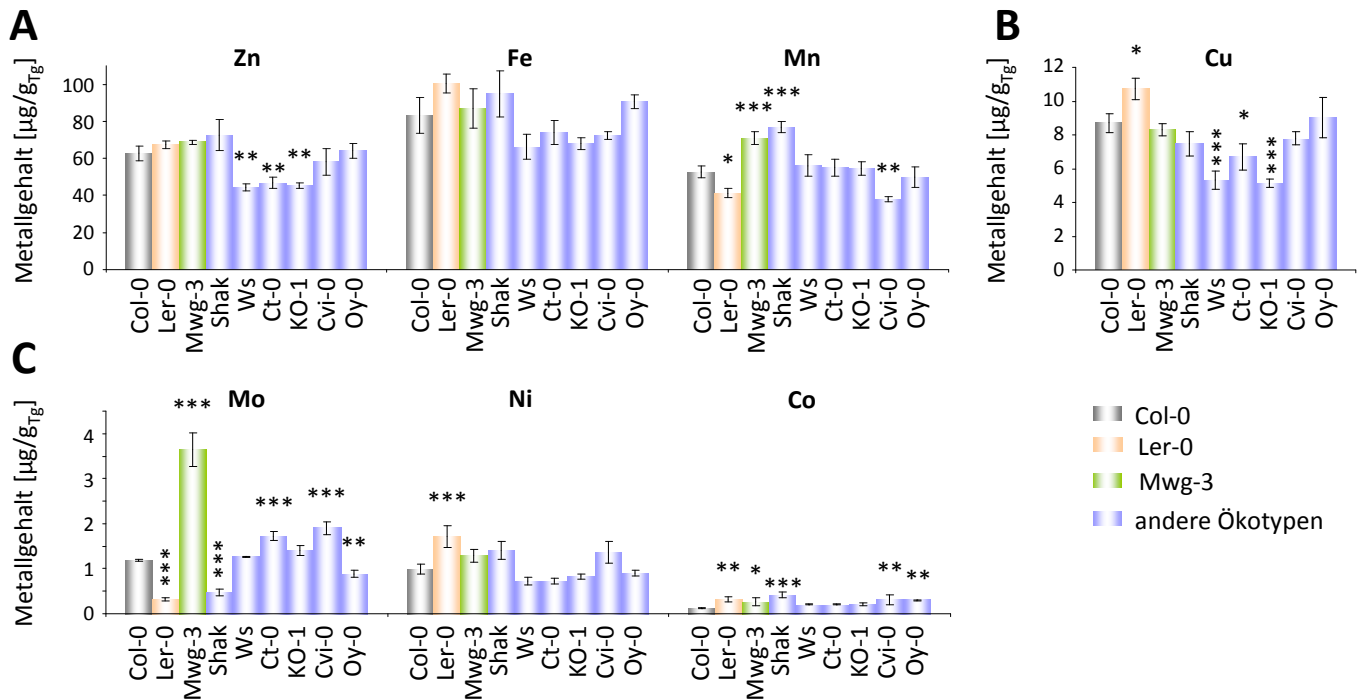
Phänotyp von Mwg-3 dargestellt anhand von repräsentativen Individuen. **(A)** Neben der rel. Wurzellänge (MW  $\pm$  SD) von Col-0 und Mwg-3 sind Pflanzen unter Mn-Stress gezeigt. **(B)** Die Anzucht einer Mwg-3 Pflanze unter Kurztagbedingungen zeigt die Bildung von Chlorosen in den Blättern im Verlaufe von 7 Tagen. **(C)** Mikroskopische Aufnahmen der Wurzel von Col-0 und Mwg-3 zeigen die Wurzelarchitektur der Ökotypen unter Kontrollbedingungen und unter Mn/Ni und Co-Stress. **(D)** Unter Kontrollbedingungen ohne Mn, zeigte Mwg-3 Mangelercheinungen nach der Keimung.

## Anhang Abbildung 7



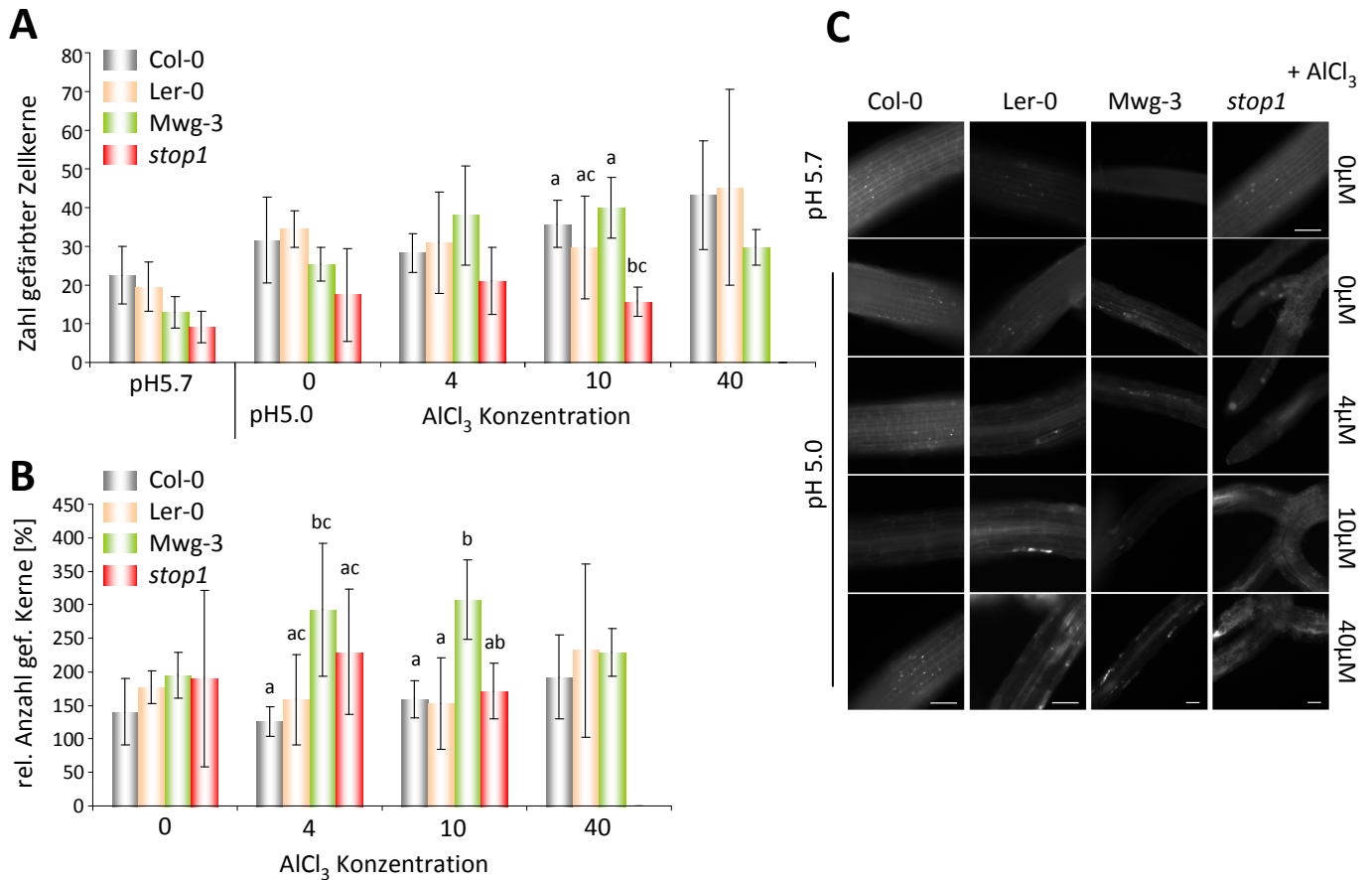
Metallakkumulation von Mwg-3 im Vergleich mit Col-0, einem anderen *A. thaliana* Ökotyp. MW  $\pm$  SD der Zn/Fe/Cu/Mn/Mo und Ni-Akkumulation in Pflanzengewebe verschiedenen Alters. Junge Blätter wurden mit älteren, grünen und braunen (teilweise seneszenten) Blättern der Blattrosette vor Beginn der Blühinduktion und seneszenten Geweben nach der Blüte verglichen. Die Abbildungen zeigen die jeweiligen Alterszustände der Pflanzen. Signifikante Unterschiede zwischen der Toleranz der Ökotypen wurden mittels Zweifels-Varianzanalyse und Tukey Test erhoben. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ,  $n = 2-3$ . Daten erhoben von A. Trampczynska 2009, unveröffentlicht.

## Anhang Abbildung 8



Metallakkumulation in den Samen von Mwg-3 (grün) im Vergleich mit den Referenzen Col-0 (grau) und Ler-0 (rosa), sowie anderen Ökotypen von *A. thaliana* (blau). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD der **(A)** Zn/Fe und Mn-Akkumulation **(B)** Cu-Akkumulation und **(C)** Mo/Ni und Co-Akkumulation. Signifikante Unterschiede zwischen der Toleranz der Ökotypen wurden mittels Einwege-Varianzanalyse und Tukey Test erhoben. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ,  $n = 2-3$ . Daten erhoben von A. Trampczynska 2009, unveröffentlicht.

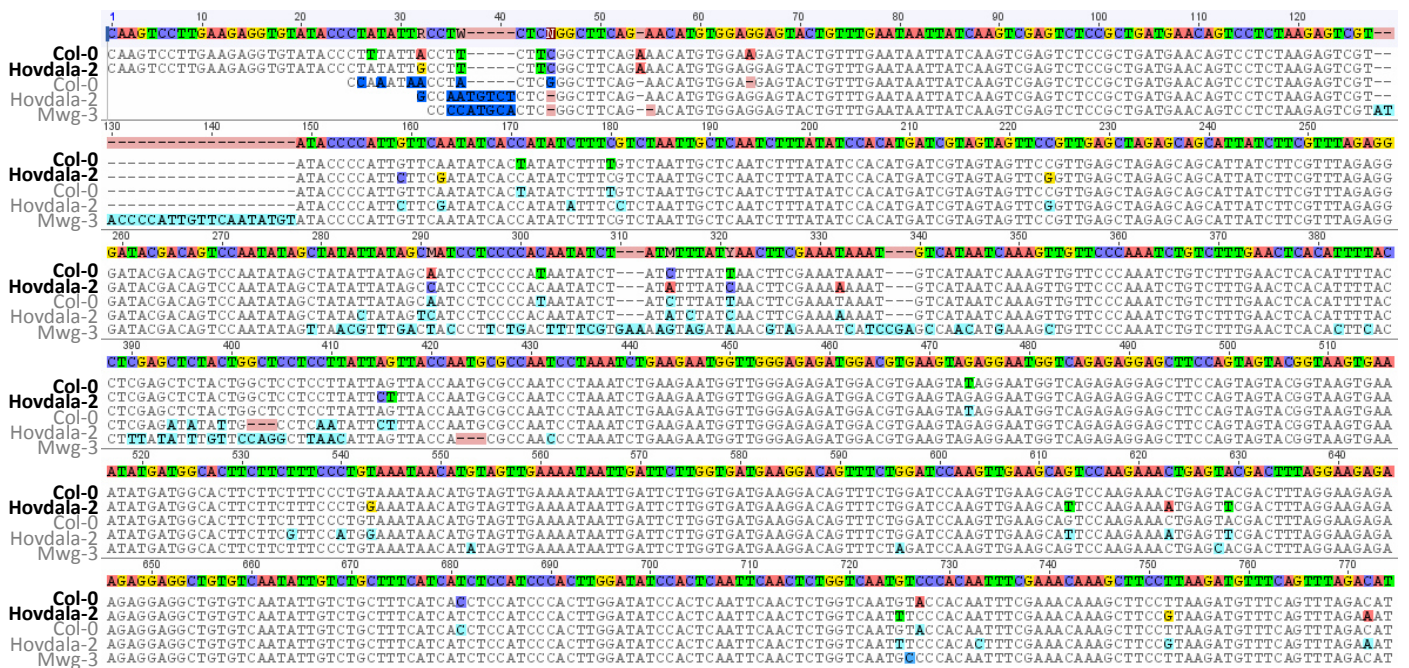
## Anhang Abbildung 9



Darstellung der Al-Toleranz von Mwg-3 durch Mikroskopie. Zellschäden der *A. thaliana* Ökotypen Col-0, Ler-0 und Mwg-3 sowie der Mutanten *stop1* welche durch Inkubation unter unterschiedlichen AlCl<sub>3</sub> Konzentrationen entstanden, wurden mikroskopisch erfasst. Das Wachstum wurde zur Kontrolle der Versuchsbedingungen erfasst. Col-0 erreichte  $38 \pm 3$  mm unter Kontrollbedingungen (K), bei pH 5.0, 0 μM AlCl<sub>3</sub>  $54 \pm 17$  % und unter 40 μM AlCl<sub>3</sub> (+Al)  $48 \pm 20$  %. Ler-0: K:  $34 \pm 2$  mm, pH 5.0:  $44 \pm 8$  %, +Al:  $29 \pm 9$  %. Mwg-3: K:  $30 \pm 5$  mm, pH 5.0:  $54 \pm 11$  %, +Al:  $56 \pm 15$  %. *stop1*: K:  $27 \pm 5$  mm, pH 5.0:  $14 \pm 5$  %, +Al:  $2.6 \pm 0.9$  %. In **(A)** ist die mittlere Anzahl an PI (Propidiumiodid) gefärbter Zellen pro Bedingung und Ökotyp dargestellt. MW  $\pm$  SD **(B)** Angegeben sind relative Werte bezogen auf die Anzahl gefärbter Kerne unter Kontrollbedingungen im 1/10 Hoagland Medium bei einem pH von 5.7, gepuffert mit MES. Signifikante Unterschiede in (A-B) wurden ermittelt durch eine Zweifach-Varianzanalyse mit Tukey Test, unterschiedliche Buchstaben definieren Gruppen mit  $p < 0.05$  signifikanten Unterschieden, innerhalb einer Behandlung, an.  $n_{\text{Total}} = 3-7$ . **(C)** Mikroskopische Aufnahmen einer PI-gefärbten Wurzel der Ökotypen Col-0, Ler-0, Mwg-3 und der Mutante *stop1* unter Kontrollbedingungen, nach pH Reduktion und nach zusätzlicher Al-Behandlung. Maßstab: 100 μm (gilt für alle Bilder des jeweiligen Genotyps, Ausnahme: *stop1*-Mutante, Kontrollbed. mit extra Maßstab). Gleiche Belichtung, Bildbearbeitung mit ImageJ 1.44p: Kontrastanpassung für alle Bilder gleich, basierend auf Histogramm des Stacks



## Anhang Abbildung 10



Sequenzierung zum Nachweis genotypischer Unterschiede zwischen Mwg-3 und Hovdala-2. Die Darstellung des Alignments der Referenzsequenzen von Col-0 und Hovdala-2 (**fett**) [179] mit den Ergebnissen der Sequenzierung von Col-0, Hovdala-2 und Mwg-3 (grau) zeigt, dass es sich bei Col-0, Hovdala-2 und Mwg-3 um 3 distinkte Ökotypen handelt.



**Anhang Tabelle 1: Primerliste**

fw: forward Primer

rev: reverse Primer

Name	Sequenz	Methode	Enzym	Lage (bp)	Chr.	Projekt	T <sub>m</sub> in °C	Beschreibung
C1_5.0Mio_fw / PX1	CCTATCATAAGCAAACAAATTCAGC	CAPS Marker	TasI	5000780	1	Cvi - Ler	60.4	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 501bp Fragment aus 709 bp Amplicon
C1_5.0Mio_rev / PX2	AGCGTTTTGATCCTCCTTACAC	CAPS Marker	TasI	5000072	1	Cvi - Ler	59.7	rev, rev., mit PX1
C1_5.6Mio_fw / PX3	ATCGAGGCAGAAACAAAACATC	CAPS Marker	BamHI	5646330	1	Cvi - Ler	60.5	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 501bp Fragment aus 842 bp Amplicon
C1_5.6Mio_rev / PX4	TTAGCCGCAAATTAATCACAC	CAPS Marker	BamHI	5647168	1	Cvi - Ler	61.2	rev., mit PX3
C1_6.3Mio_fw / PX5	AACAAGTTATGTTGCTGTGCAC	CAPS Marker	RasI	6278745	1	Cvi - Ler	60.4	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 501bp Fragment aus 790 bp Amplicon
C1_6.3Mio_rev / PX6	CATGAACATGGACAAGGACTTC	CAPS Marker	RasI	6279409	1	Cvi - Ler	59.5	rev., mit PX5
C1_6.9Mio_fw / PX7	GGAGTCAAACGTCATCACAAAC	CAPS Marker	MluI	6931041	1	Cvi - Ler	59.5	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 501bp Fragment aus 739 bp Amplicon
C1_6.9Mio_rev / PX8	TGGGCATTCTGTGTTTATCTTG	CAPS Marker	MluI	6931779	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX7
C1_7.6Mio_fw / PX9	GGAGCGGATGTGAGTTATCTTC	CAPS Marker	TasI	7575417	1	Cvi - Ler	60.1	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 501bp Fragment aus 824 bp Amplicon
C1_7.6Mio_rev / PX10	TGTTGGTGAAGCTTTTGTTC	CAPS Marker	TasI	7576240	1	Cvi - Ler	60.2	rev., mit PX9
C1_5.0Mio_fw / PX11	ACCGTTTCAAAGCTGAGAATG	CAPS Marker	TasI	8197441	1	Cvi - Ler	60.6	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 501bp Fragment aus 711 bp Amplicon
C1_5.0Mio_rev / PX12	TCTGCTAGTTCTCCTCGTTCC	CAPS Marker	TasI	8198151	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX11
PX13	TCCCCAAACAAACATATGAAGC	CAPS Marker	TaqI	8182338	1	Cvi - Ler	61	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 174, 108bp Fragment aus 282bp Fragment, Amplicon 732
PX14	CTTCCAACACTCTCGTTATGG	CAPS Marker	TaqI	8183209	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX13
PX15	ACGAGGGTGTCTAGATGAGC	CAPS Marker	DraI	7724364	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 279, 237bp Fragment aus 516bp Fragment, 247bp werden immer abgeschnitten Amplicon
PX16	AGTTGACCCATGAATTTTGACC	CAPS Marker	DraI	7725364	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX15
PX17	GAAATCAACCTCATTGTTGGC	CAPS Marker	TruI	7871331	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 474, 226bp Fragment aus 700bp Amplicon
PX18	CAATGCATAGGGATCATCAGC	CAPS Marker	TruI	7872331	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX17
PX19	GGTACTCGTATCTCCATGAGTCG	CAPS Marker	TruI	8016922	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 408, 401, 92, ...bp Fragment aus 900bp Amplicon
PX20	TCTTCCCTAGCAGCTGAAAC	CAPS Marker	TruI	8017922	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX19
PX21	AAACTGTGAGCCCTCTATTTTC	CAPS Marker	Sall	6545867	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 500, 203bp Fragment aus 700bp Amplicon
PX22	GTAGAAGTCTCCAGCAACG	CAPS Marker	Sall	6546867	1	Cvi - Ler	59	rev., mit PX21
PX23	TCTCCTACGTGTGATCAGGTG	CAPS Marker	TaqI	6780378	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 491, 247, 12bp Fragment aus 750bp Amplicon
PX24	GGTTGAACTCAAAGCTGAAAG	CAPS Marker	TaqI	6781378	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX23
PX25	TGACATCAGCTCCTATTGCATC	CAPS Marker	SacI	7052818	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 493, 349bp Fragment aus 842bp Amplicon
PX26	GTCGTCATCTAAGCCAAGGAC	CAPS Marker	SacI	7053818	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX25
PX27	AGCTGACATGGCACAGATGTAG	CAPS Marker	TaqI	8160226	1	Cvi - Ler	60	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Ler --> 489, 413, 38bp Fragment aus 900bp Amplicon
PX28	AGGAACCATGAAGGAGAGGAAG	CAPS Marker	TaqI	8161226	1	Cvi - Ler	61	rev., mit PX27
PX29	GTCCTACCCGTGTTATCCAAC	CAPS Marker	PstI	8168682	1	Cvi - Ler	62	Fragment zur Unterscheidung Cvi / Ler; Schnittstelle in Cvi --> 471, 246bp Fragment aus 700bp Amplicon
PX30	TGTCCATTCTGTAACCTCCATAC	CAPS Marker	PstI	8169682	1	Cvi - Ler	60	rev., mit PX29

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

C5_3.1Mio _fw 7 / RV1	GAGGGAGAGGGAAGAAGAGAAG	CAPS Marker	TasI	3121508	5	Bur - Col	60	Fragment zur Unterscheidung Bur / Col; Schnittstelle in Col --> 501bp Fragment aus 776 bp Amplicon
C5_3.1Mio _rev / RV2	ACCACACTCCTCGGTATATTAC	CAPS Marker	TasI	3120733	5	Bur - Col	59.3	rev., mit RV1
C5_3.3Mio _fw / RV3	GATGCCATAGAGATGAATGCAG	CAPS Marker	TaqI	3343407	5	Bur - Col	59.7	Fragment zur Unterscheidung Bur / Col; Schnittstelle in Bur --> 501bp Fragment aus 736 bp Amplicon
C5_3.3Mio _rev / RV4	ATGGGCCTATGTGAATCAACC	CAPS Marker	TaqI	3344142	5	Bur - Col	60	rev., mit RV3
C5_3.6Mio _fw / RV5	ATCCTACAAGACGAACCCTGAC	CAPS Marker	TasI	3566191	5	Bur - Col	59.5	Fragment zur Unterscheidung Bur / Col; Schnittstelle in Bur --> 501bp Fragment aus 753 bp Amplicon
C5_3.6Mio _rev / RV6	AACTGTGTATTTCCACGTACCC	CAPS Marker	TasI	3566944	5	Bur - Col	60	rev., mit RV5
C5_3.8Mio _fw / RV7	TGTTGTGCCTTGATTTTCAGTC	CAPS Marker	TasI	3782719	5	Bur - Col	60.2	Fragment zur Unterscheidung Bur / Col; Schnittstelle in Col --> 501bp Fragment aus 709 bp Amplicon
C5_3.8Mio _rev / RV8	TGGGTGCAATTTCTCCTCTAC	CAPS Marker	TasI	3783427	5	Bur - Col	60.5	rev., mit RV7
RV9	TTTCCTTACAAGCCTGAAATATCC	CAPS Marker	BseLI	3109566	5	Bur - Col	60	Fragment zur Unterscheidung Bur / Col; Schnittstelle in Col --> 506, 330bp Fragment aus 836 bp Amplicon
RV10	AAACACATCGCACATTTTGAAC	CAPS Marker	BseLI	3110566	5	Bur - Col	60	rev., mit RV9
RV11	TTCTCAGATCATCCATGTGTC	CAPS Marker	KpnI	3558287	5	Bur - Col	60	Fragment zur Unterscheidung Bur / Col; Schnittstelle in Col --> 482, 375bp Fragment aus 857 bp Amplicon
RV12	TGCAAACTACTAATGCTCCAACG	CAPS Marker	KpnI	3559287	5	Bur - Col	60	rev., mit RV11
SF001	AAGATACGTGAACGCAAGTG	Tetraprimer		6281489	1	Cvi - Ler	60	Cvi spezifisch mit SF002; Paar: 1.1.1
SF002	GTGGAGGCTGCTTCTTCAGCT	Tetraprimer		6281660	1	Cvi - Ler	66	mit SF001
SF003	TCGCATCCACTGCTTCTTCC	Tetraprimer		6281660	1	Cvi - Ler	67	Ler spezifisch mit SF004; Paar:1.2.1
SF004	ATGATAACGGAGTCGGAGAG	Tetraprimer		6281879	1	Cvi - Ler	60	mit SF003
SF005	GACTGGTCACTGCAAGATAGTTCC	Tetraprimer		6918773	1	Cvi - Ler	64	Ler spezifisch mit SF006/SF007; Paar: 2.1.1
SF006	CATCTCAGTTACACCATTC	Tetraprimer		6918578	1	Cvi - Ler	60	mit SF005
SF007	CAAGCTCACCAACTGCTACA	Tetraprimer		6919016	1	Cvi - Ler	61	Ler spezifisch; mit fw 2.1.1, SF005 Paar: 2.1.2
SF008	CTCACCATATCCACCAAAT	Tetraprimer		6918583	1	Cvi - Ler	60	Cvi spezifisch mit SF009; Paar: 2.2.1
SF009	TACAATTCGCTAGATCTCAGGTCC	Tetraprimer		6918752	1	Cvi - Ler	64	mit SF008
SF010	GCCAGATCTGTCGAAGGTACA	Tetraprimer		6277947	1	Cvi - Ler	63	mit SF011
SF011	TGGAATCTTCTACAACAAATGCAAAC	Tetraprimer		6277762	1	Cvi - Ler	65	Cvi spezifisch mit SF010; Paar: 1.1.2
SF012	CGCTGAAGCTGCTCTCAAAGAAAC	Tetraprimer		6277762	1	Cvi - Ler	68	mit SF013
SF013	CCTCAGTAGAGCTCCCATCAAT	Tetraprimer		6278018	1	Cvi - Ler	63	Ler spezifisch mit SF012; Paar: 1.2.2; umfasst zusätzlichen SNP, spezifität hier durch SF012
SF014	CGTATTCTTCCGCCTTCATCG	Tetraprimer		6932568	1	Cvi - Ler	69	Cvi spez. Mit SF015; Paar: 2.1.3
SF015	TAACAGCTTCCACGTGTCTTC	Tetraprimer		6932770	1	Cvi - Ler	61	mit SF014
SF016	GGCATGTACAGCCTCAGAA	Tetraprimer		6932418	1	Cvi - Ler	61	Ler spe. Mit SF017; Paar: 2.2.2
SF017	AAGTCAGTCCGTAATGGCGTGGATTCG	Tetraprimer		6932568	1	Cvi - Ler	69	mit SF016
SF018	CCAACACTCATCAACGGTTCATCAT	Sequenzierungsprimer		8165000	1	Cvi - Ler	69	fw Primer in At1G23040
SF019	TGTAATCGTCGTCGGTCCACTAA	Sequenzierungsprimer		8164680	1	Cvi - Ler	67	rev. Primer mit SF018
SF020	CGATACCATAAGAGAGTTTCCTC	Sequenzierungsprimer		8160200	1	Cvi - Ler	59.4	fw Primer in At1G23040
SF021	GGTCCACTAATTGGTCGTATT	Sequenzierungsprimer		8164700	1	Cvi - Ler	59	rev. Primer mit SF020

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

SF022	gttgaggctgcttcttc	Tetraprimer	6281660	1	Cvi - Ler	55	rev. mit SF001 Cvi spezifisch	
SF023	attgaggctgcttcttc	Tetraprimer	6281660	1	Cvi - Ler	55	rev.mit SF001 Ler spezifisch (alternative	
SF024	TCACATCCACTGCTTCT	Tetraprimer	6281660	1	Cvi - Ler	55	fw.mit SF004 Ler spezifisch (für tetraprimerkomb SF001/22/4/24)	
SF025	CCACATCCACTGCTTCT	Tetraprimer	6281660	1	Cvi - Ler	55	fw. mit SF004 Cvi spezifisch (für tetraprimerkomb SF001/23/4/25)	
SF026	CGtATTCTTCTCCGCCT	Tetraprimer	6932568	1	Cvi - Ler	57	fw. mit SF015 Cvi spezifisch	
SF027	TGtATTCTTCTCCGCCTT	Tetraprimer	6932568	1	Cvi - Ler	57	fw. mit SF015 Ler spezifisch	
SF028	gaGtcagtcgtaatggc	Tetraprimer	6932568	1	Cvi - Ler	57	rev. mit SF016 Cvi sp. (SF016,028,015,027)	
SF029	aaGtcagtcgtaatggc	Tetraprimer	6932568	1	Cvi - Ler	57	rev. mit SF016 Ler sp. (SF016,029,015,026)	
SF030	GAATGGAGCTTCAC TTCATCC	Klonierungsprimer	8163325	1	Cvi - Ler	62	fw mit SF031 für Klonierung von g_At1G23039	
SF031	gataagcggtccttaggttatagtca	Klonierungsprimer	8166320	1	Cvi - Ler	61	rev mit SF030 für Klonierung von g_At1G23040	
SF032	CTTAGCATCAGAAATCCATGA	Tetraprimer	2900008	5	Bur - Col	57	fw. mit SF033 Bur-0 spezifisch	
SF033	tggatgaagaaggtcacattatac	Tetraprimer	2900234	5	Bur - Col	60	rev. mit SF032 Bur-0 spezifisch	
SF034	ACTCGCTTGAAGCtCT	Tetraprimer	2900008	5	Bur - Col	57	rev. mit SF035 Col-0 spezifisch	
SF035	ATTCTGAATGGTGCGTGG	Tetraprimer	2899598	5	Bur - Col	61	fw. mit SF034 Col-0 spezifisch	
SF036	CATGTCCTTTGGTTTCACAAT	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	60	Cvi Sequenz in pCR8-At1G23040	
SF037	CGCATTAAAGCAACTACACGTAC	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	60	Cvi Sequenz in pCR8-At1G23040	
SF038	CTCACATGAAAAATACGACCA	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	60	Cvi Sequenz in pCR8-At1G23040	
SF039	ATGAGGTCGATCCCATAAAG	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	60	Cvi Sequenz in pCR8-At1G23040	
SF040	GGAAATCTCTACCCCGTTG	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	60	Cvi Sequenz in pCR8-At1G23040	
SF041	ccggcatgttgtgaacttgtga		8165040	1	Cvi - Ler	71	rev Primer zum test der SALK TDNA Insertionslinie 073423,	
SF042	AATGTATAGTTTAAAGCCTTTTG		8164540	1	Cvi - Ler	40	fw Primer zum test der SALK TDNA Insertionslinie 073423	
SF043	ggagagcttcaccaccataa		8165399	1	Cvi - Ler	63	rev Primer zum test der SALK tDNA insertionslinie 118693	
SF044	agtctatgactcccatgcactt		8164848	1	Cvi - Ler	61	fw Primer zum test der SALK tDNA insertionslinie 118693	
SF045	ATGCCGGGAAATTCTACCG	Klonierungsprimer		1	Cvi - Ler	69	fw Primer in coding Region of At1G23040	
SF046	tgggcagtaggaactgactt	Klonierungsprimer		1	Cvi - Ler	60	rev Primer (für SF045) in coding Region of At1G23041	
SF047	ACGAGTCTGCAAACCTCA	Q-PCR		5	Bur - Col	63.1	fw mit rev SF048, At5G13550, liegt in Exon 13 und 14, SULFATE TRANSPORTER 4.1, SULTR4;1	
SF048	atcccgttgtatgtgtaagcct	Q-PCR		5	Bur - Col	62.9	rew mit fw SF047, At5G13550, liegt in Exon 13 und 14, SULFATE TRANSPORTER 4.1, SULTR4;1	
SF049	CTAGGCAACCAAGCTTTTCTTC	CAPS Marker	HpaII	6622781	1	Cvi - Ler	62.6	fw Primer; mit SF050
SF050	accatagcaaggggatttag	CAPS Marker	HpaII	6623481	1	Cvi - Ler	62.5	rev Primer; mit SF049, Cvi: 267bp und 597bp; Ler:362bp, 267bp, 235bp
SF051	GGTATGGGTACCTTCGTAACCTTG	CAPS Marker	HpaII	6702372	1	Cvi - Ler	65	fw Primer; mit SF052
SF052	ggatcaattcgtgtcaaaatcc	CAPS Marker	HpaII	6703062	1	Cvi - Ler	63	rev Primer; mit SF051, Cvi: 109bp und 234bp, 340bp; Ler:100bp, 574bp
SF053	tgaatttgcagtgtgtcacaaaa	AFLP Marker		6722766	1	Cvi - Ler	69.5	fw Primer mit SF054, Längenpolymorphismus
SF054	tcacactcctcacaactcaagaccat	AFLP Marker		6723508	1	Cvi - Ler	68	rev Primer mit SF053; Längenpolmorphismus zwischen Cvi und Ler, Cvi länger (700bp)
SF055	gctcgaccatctcgcataaa	AFLP Marker		6911880	1	Cvi - Ler	67.8	fw Primer mit SF056, Längenpolymorphismus

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

SF056	tgttaccgtgtgaaagtctatatgtgtgg	AFIP Marker		6912023	1	Cvi - Ler	67.8	rev Primer mit SF055; Längenpolmorphismus zwischen Cvi und Ler, Cvi länger (700bp)
SF057	TTAATTGCTGCTGGAAGTATG	CAPS Marker	Apal	6828138	1	Cvi - Ler	63.5	fw Primer; mit SF058
SF058	CAATTTCTACAGAGGGTGGACA	CAPS Marker	Apal	6828138	1	Cvi - Ler	65.6	rev Primer; mit SF057; Cvi: 820bp; Ler:412bp, 407bp
SF059	tGATTCTAAGCAAGTTTGAAt	CAPS Marker	Rsal	6862997	1	Cvi - Ler	60.3	fw Primer; mit SF060
SF060	CCCTAGATCGAGTGAGAACATC	CAPS Marker	Rsal	6862997	1	Cvi - Ler	61.3	rev Primer; mit SF059, Ler: 770bp; Cvi:404bp, 371bp
SF061	tgtcgtttgacataagaatgatg	Sequenzierungsprimer			4	Bur - Col	61	fw N-terminalen Region von Col-AthMA3, vgl zu Bur
SF062	cggatattgaagctactatgaagc	Sequenzierungsprimer			4	Bur - Col	61.5	rev (mit SF061) N-terminalen Region von Col-AthMA3, vgl zu Bur
SF063	GGAACGAAGAAGGAACAGCT	Q-PCR		17440771	4	Bur - Col	61.9	fw mit rev SF064, At4G36990, liegt in Exon 1 und 2, ARABIDOPSIS THALIANA CLASS B HEAT SHOCK FACTOR B1
SF064	cccattttccggtacagttt	Q-PCR		17442821	4	Bur - Col	61.1	rev mit fw SF063, At4G36990, liegt in Exon 1 und 2, ARABIDOPSIS THALIANA CLASS B HEAT SHOCK FACTOR B1
SF065	cACATGTAGTCGGTAACTCTTG	Klonierungsprimer			4	Bur - Col	58.8	fw für gDNA HMA3 in Bur mit SF066
SF066	atgcgttatgagccttca	Klonierungsprimer			4	Bur - Col	58.9	rev für gDNA HMA3 in Bur mit SF065
SF067	CAATGCTCATAAGCTTTACTCTAGTG				5	Bur - Col	61	fw mit SF068 in wt situation ein fragment von250 bp, mit LBa1 in SALK_054520C (T-DNA Insertion in Sult4.1) kein Fragment
SF068	caacatcatggatctagacgg				5	Bur - Col	61	rev mit SF067 in wt situation ein fragment von250 bp, mit LBa1 in SALK_054520C (T-DNA Insertion in Sult4.1) 250bp
SF069	TACTCACACCAACAAGGACAC				5	Bur - Col	60	fw mit SF070 in wt situation in 460bp Fragment, mit LBa1 in SALK_103873C (T-DNA Insertion in Sult4.1) ein 370bp Fragment (ca. 170 und 200bp in TDNA)
SF070	aatctgtgaatgtcctgaatgc				5	Bur - Col	62	rev mit SF069 in wt situation in 460bp Fragment, mit LBa1 in SALK_103873C (T-DNA Insertion in Sult4.1) kein Fragment
SF071	tagtaagtgtgttcctctgtg	Klonierungsprimer			4	Bur - Col	59	rev Primer in Kombination mit SF065 für Teil A des genomischen HMA3 Bur
SF072	GCTAATGTCTCTAGACAATCACCA	Klonierungsprimer			4	Bur - Col	61	fw Primer in Kombination mit SF066 für Teil B des genomischen HMA3 Bur
SF073	GATTTTCGCACAATCAAGAC	CAPS Marker	TaqI	6352420	1	Cvi - Ler	59.3	fw mit SF074
SF074	GCACAGACTAATGGTGAAATC	CAPS Marker	TaqI	6352420	1	Cvi - Ler	58.3	rev mit SF073, Cvi(180,23,262,116,151,46,21) und Ler (180,23,381,151,46,21)
SF075	AGCATCGGATAAACCTTTCA	CAPS Marker	TasI	6429517	1	Cvi - Ler	60.9	fw mit SF076
SF076	ATCTTGACGATACATCTCGT	CAPS Marker	TasI	6429517	1	Cvi - Ler	60.7	rev mit SF075, Cvi(324,149,119,212) und Ler (473,119,212)
SF077	AGGCTGAAGAAGGTGATG	CAPS Marker	XbaI	6476528	1	Cvi - Ler	57	fw mit SF078
SF078	GTTTGGAAGAGTTTGACGAT	CAPS Marker	XbaI	6476528	1	Cvi - Ler	57.8	rev mit SF077, Cvi: 390, 360; Ler: 750
SF079	CTGACCTTTTGAATTGCAC	CAPS Marker	Tail	6584898	1	Cvi - Ler	57.8	fw mit SF080
SF080	CCTCTCTGGGTCAAGCT	CAPS Marker	Tail	6584898	1	Cvi - Ler	57.5	rev mit SF079, Ler: 469, 54, 192; Cvi: 523, 192
SF081	TGAGTACCTAAGTCGCAAAA	Sequenzierungsprimer				Bur - Col	56	fw für HMA3 genomischens Fragment mit SF65 und SF066
SF082	CGATTAAATGAGGATTAACCGAA	Sequenzierungsprimer				Bur - Col	60	fw für HMA3 genomischens Fragment mit SF65 und SF066
SF083	TACTTCAGAACATGATCAAC	Sequenzierungsprimer				Bur - Col	54	fw für HMA3 genomischens Fragment mit SF65 und SF066
SF084	GCTTGAGATCTCGGACTAA	Sequenzierungsprimer				Bur - Col	56	fw für HMA3 genomischens Fragment mit SF65 und SF066
SF085	TGAGCCAGTGGTTTTATAGTGG	CAPS Marker	TasI	6353364	1	Cvi - Ler	62.4	fw mit SF086, Cvi: 99, 100, 239, 458, 16; Ler:99, 100, 695, 18;
SF086	ctgcatttctgaatttctctagc	CAPS Marker	TasI	6353364	1	Cvi - Ler	61.8	rev mit SF085, Cvi: 99, 100, 239, 458, 16; Ler:99, 100, 695, 18
SF087	GACAATGGGTCAAGTTCTTC	CAPS Marker	HindIII	6458300	1	Cvi - Ler	59	fw mit SF088, Cvi: 39, 780 ; Ler:39, 285, 459

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

SF088	CACCAACATTGGATGGTCT	CAPS Marker	HindIII	6458300	1	Cvi - Ler	61	rev mit SF087, Cvi: 39, 780 ; Ler:39, 285, 459 ; Position: 6458300 auf Chromosom 1
SF089	ACTCTCTCTCTCTGGCGATG	CAPS Marker	HindIII	6475261	1	Cvi - Ler	63	fw mit SF090, Cvi: 393, 550 ; Ler:393, 63, 487
SF090	tgcaacagcttgagttacttaca	CAPS Marker	HindIII	6475261	1	Cvi - Ler	62	rev mit SF089, Cvi: 393, 550 ; Ler:393, 63, 487
SF091	TGATGATGGTCATCAACAACAG	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	63	fw. mit SF092, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G18960
SF092	gcgataatcgattcaacgaac	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	62.8	rev. mit SF091, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G18960
SF093	GATTCTGACCTTTTGAATTGCA	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	62	fw. mit SF094, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G19060
SF094	caagctttatgctagtcg	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	62	rev. mit SF093, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G19060
SF095	CGTCTAAAAGCTGGTAATT	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	60	fw. mit SF096, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G19070
SF096	attgcttgacacgcaat	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	60	rev. mit SF094, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G19070
SF097	ctgaggattcatcgatgtt	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	57	fw. mit SF098, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G19090
SF098	agcatctatcactatggattcg	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	59	rev. mit SF097, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G19090
SF099	AACTTGACTCGGATCTTACAC	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	57	fw. mit SF100, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G18810
SF100	gcatgaagctagatcatgttg	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	59.5	rev. mit SF099, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G18810
SF101	CTGATAGAGCTTTGGGCGT	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	61.5	fw. mit SF102, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G18485
SF102	cgaagctggattccataca	Sequenzierungsprimer			1	Cvi - Ler	61	rev. mit SF101, Cvi - Ler spezifisches Fragmente auf AT1G18485, Primer enthält einen Cvi SNP
SF103	CGTTACCTCGACTTAAACG	Klonierungsprimer		6551254	1	Cvi - Ler	57	fw Primer, At1G18960 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF104	cttctacgttgtcacccatat	Klonierungsprimer		6555428	1	Cvi - Ler	57.8	rev Primer, At1G18960 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF105	CACAAATCAAGAGATAGTCATCC	Klonierungsprimer		6580906	1	Cvi - Ler	58.8	fw Primer, At1G19060 mit den flankierenden genomischen Regionen; Primer funktioniert höchstwahrscheinlich nur mit Cvi Sequenz
SF106	acatctagagagttgaacagtaacag	Klonierungsprimer		6584247	1	Cvi - Ler	58	rev Primer, At1G19060 mit den flankierenden genomischen Regionen;
SF107	CCAATGCATGACAGCCTCTTGT	Klonierungsprimer		6582854	1	Cvi - Ler	67.9	fw Primer, At1G19070 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF108	gcctctttgtatctgatcttaacgcag	Klonierungsprimer		6585814	1	Cvi - Ler	67	rev Primer, At1G19070 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF109	CCAAGATCCTAGCTCACAAATG	Klonierungsprimer		6361598	1	Cvi - Ler	63	fw Primer, At1G18485 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF110	cttcacatagtgagatgggaatttc	Klonierungsprimer		6366495	1	Cvi - Ler	64	rev Primer, At1G18485 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF111	GGAGTTGTTGGCTCTAGTTGGGTAT	Klonierungsprimer		6484113	1	Cvi - Ler	66.6	fw Primer, At1G18810 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF112	gcatatcaacaataataccaagccagtt	Klonierungsprimer		6488032	1	Cvi - Ler	66.8	rev Primer, At1G18810 mit den flankierenden genomischen Regionen
SF113	GGAAAATCCAATCCACAGAT	CAPS Marker	TaqI	3652793	5	Bur - Col	59.7	fw mit SF114, Schnittstelle in Bur nicht in Col: 308 und 476 statt 737 bp Fragmente
SF114	GCAGCATCGTATGTACCAAT	CAPS Marker	TaqI	3653530	5	Bur - Col	59.7	rev mit SF113, Schnittstelle in Bur nicht in Col: 308 und 476 statt 737 bp Fragmente
SF115	GGATATTCCACTTTAGACCAAGTA	CAPS Marker	Bsp119I	3725749	5	Bur - Col	58.8	fw mit SF116, Schnittstelle in Col nicht in Bur: 270, 140 und 280 statt 410 und 280 bp Fragmente, 682 gesamtgröße
SF116	gctagagtttagattttgcatctaaag	CAPS Marker	Bsp119I	3726431	5	Bur - Col	58.7	rev mit SF115, Schnittstelle in Col nicht in Bur: 270, 140 und 280 statt 410 und 280 bp Fragmente
SF117	CCATTAATACCCTCAAGAAAGC	CAPS Marker	TruI	3854090	5	Bur - Col	60	fw mit SF118, Schnittstelle in Bur nicht in Col: 339, 109, 176 und kleine Fragmente statt 448 und 176 sowie kleine Fragmente, 830 Gesamtgröße
SF118	aaggtattccctcaggtcgt	CAPS Marker	TruI	3854920	5	Bur - Col	61	rev mit SF117, Schnittstelle in Bur nicht in Col: 339, 109, 176 und kleine Fragmente statt 448 und 176 sowie kleine Fragmente
SF119	GGAGCAATACCTTGTAATGAGTG	CAPS Marker	BseI	3963753	5	Bur - Col	61	fw mit SF120, Schnittstelle in Col nicht in Bur: 141, 216 und 376 statt 141 und 592, 800 Gesamtgröße

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

SF120	gatggtgatataaggcgacat	CAPS Marker	BseLI	3964553	5	Bur - Col	63	rev mit SF119, Schnittstelle in Col nicht in Bur: 141, 216 und 376 statt 141 und 592
SF121	cctgagctatggtagaacaag	Klonierungsprimer		6553668	1	Cvi - Ler	57.8	rev Primer mit SF103 für Fragment A von At1G18960, Fragmentgröße 2214
SF122	AgCCTAATGATTGAGGAGATC	Klonierungsprimer		6553504	1	Cvi - Ler	58.5	fw Primer mit SF104 für Fragment B von At1G18960, Cvi spezifische Sequenz!!!, Fragmentgröße 2143
SF123	cttgcaagattcagttagc	Klonierungsprimer		6583031	1	Cvi - Ler	58.8	rev Primer mit SF105 für Fragment A von At1G19060, Fragmentgröße 2127
SF124	GGTGGTCACACCTATGAAACATTATTATTC	Klonierungsprimer		6582829	1	Cvi - Ler	58.9	fw Primer mit SF106 für Fragment B von At1G19060, Fragmentgröße 2096
SF125	tcatgagggtttgtccacaac	Klonierungsprimer		6584638	1	Cvi - Ler	67.7	rev Primer mit SF107 für Fragment A von At1G19070, Fragmentgröße 1584
SF126	GCCACATTCTATCTTCTCTCCGA	Klonierungsprimer		6584491	1	Cvi - Ler	67.6	fw Primer mit SF108 für Fragment B von At1G19070, Fragmentgröße 1524
SF127	gtctcagaacatcaacgtcc	Klonierungsprimer		6364318	1	Cvi - Ler	60.8	rev Primer mit SF109 für Fragment A von At1G18485, Fragmentgröße 2573
SF128	CTTAACAATGCTCTAATGGACATG	Klonierungsprimer		6364156	1	Cvi - Ler	62.8	fw Primer mit SF110 für Fragment B von At1G18485, Fragmentgröße 2487
SF129	ggtttagatgttgcgtccctgt	Klonierungsprimer		6486412	1	Cvi - Ler	66.6	rev Primer mit SF111 für Fragment A von At1G18810, Fragmentgröße 2108
SF130	GCGATATCGGACCTTTGAATAGG	Klonierungsprimer		6486205	1	Cvi - Ler	65.9	fw Primer mit SF112 für Fragment B von At1G18810, Fragmentgröße 2019
SF131	CCATATTGACTAGAGTGAGAGTGATG	Klonierungsprimer		6758666	1	Cvi - Ler	61	fw Primer mit SF132 mit flankierenden genomischen Regionen, At1G19520
SF132	gtgagcgacttgacactt	Klonierungsprimer		6764166	1	Cvi - Ler	61	rev Primer mit SF131 mit flankierenden genomischen Regionen, Fragmentgröße 5500, At1G19520
SF133	GCTATGGAGGTCATTGATGG	Klonierungsprimer		6761312	1	Cvi - Ler	63	fw Primer mit SF132 für Fragment B von At1G19520, Fragmentgröße 2854
SF134	gcatacaagtaccaccttga	Klonierungsprimer		6761442	1	Cvi - Ler	62	rev Primer mit SF131 für Fragment A von At1G19520, Fragmentgröße 2776
SF135	CCTCCTCTCTAGACAAGCGAT	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	61	fw mit SF136 zur Überprüfung des not tol AA Exchanges in Ler in Gen At1G19520
SF136	cccagatagtagcccatagatc	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	60	fw mit SF135 zur Überprüfung des not tol AA Exchanges in Ler in Gen At1G19520
SF137	CCGACGTAAATGCCAGTT	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	60	fw Primer zur Überprüfung von At1G18810 (genomisches Fragment)
SF138	ATTGTCAGCTTTGATATTGGC	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	60	fw Primer zur Überprüfung von At1G18810 (genomisches Fragment)
SF139	CTACAATTACTAATGTCTATGCA	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	54	fw Primer zur Überprüfung von At1G18960 (genomisches Fragment)
SF140	GAGTGATCATTTGAATACCATC	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	56	fw Primer zur Überprüfung von At1G18960 (genomisches Fragment)
SF141	GGAAGATATGCGCTGCTTATT	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	64	fw Primer zur Überprüfung von At1G18485 (genomisches Fragment)
SF142	CTATGACAACTAGCTTCTCCGTG	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	61	fw Primer zur Überprüfung von At1G18485 (genomisches Fragment)
SF143	ATGTATGCCAAGAATGGTTCT	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	59	fw Primer zur Überprüfung von At1G18485 (genomisches Fragment)
SF144	CCAATCCATATTCTGCGGA	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	63	fw Primer zur Überprüfung von At1G19070 (genomisches Fragment)
SF145	GCCTAACTTTGACATACAGTAAACC	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	61	fw Primer zur Überprüfung von At1G19520 (genomisches Fragment)
SF146	TCGAGGAAGCTGAGCAGC	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	64	fw Primer zur Überprüfung von At1G19520 (genomisches Fragment)
SF147	GTCTGCCACGCATCGTACA	Sequenzierprimer			1	Cvi - Ler	65	fw Primer zur Überprüfung von At1G19520 (genomisches Fragment)
SF148	CAACATATTGAATCGATGAAGC	Klonierungsprimer			1	Cvi - Ler	60	ersatz für SF107, 177bp weiter am Gen
SF149	ctaagatcgactgatcgagc	Klonierungsprimer			1	Cvi - Ler	59.7	ersatz für SF108, obwohl dieser im nächsten Gen liegt, 297bp weiter am Gen
SF150	CACCAGTTTACTATCCATCGG	Sequenzierprimer		4072141	1	Bur - Col	60	fw Primer
SF151	gaaagcaatctgcgtccttaa	Sequenzierprimer		4073105	1	Bur - Col	63	rev Primer
SF152	atatggtagagatgaagaatgctg	Sequenzierprimer		3796026	5	Bur - Col	59	fw Primer für Überprüfung von T37 und T11

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

SF153	cacatattaataactacgtgtccgtt	Sequenzierprimer	3797032	5	Bur - Col	60	rev Primer mit SF152 für Überprüfung von T37 und T12
SF154	CCAACAGGCTCAAATGTATC	Sequenzierprimer	3820795	5	Bur - Col	59.2	fw Primer für Sequenzierung von T37 und T11
SF155	cctaaatcctttgaaacagac	Sequenzierprimer	3821783	5	Bur - Col	58	rev Primer mit SF154 für Sequenzierung von T37 und T12
SF156	cagtttcgtaaacctcgcat	Sequenzierprimer	3845583	5	Bur - Col	61	fw Primer für Sequenzierung von T37 und T11
SF157	acgatgttataaccacggt	Sequenzierprimer	3846526	5	Bur - Col	58	rev mit SF156 Primer für Sequenzierung von T37 und T12
SF158	gcaaaagggacttacggtt	Klonierungsprimer		5	Bur - Col	60	fw Primer, At5G11790 Fragment A mit SF159, ganzes gDNA Stück mit SF161
SF159	cacattactgcaccaagctcg	Klonierungsprimer	3801295	5	Bur - Col	60	rev Primer, At5G11790 Fragment A mit SF158
SF160	ccggagactaggcagaaga	Klonierungsprimer	3801202	5	Bur - Col	61	fw Primer, At5G11790 Fragment B mit SF161
SF161	catcttgggatattgttgaatg	Klonierungsprimer	3803837	5	Bur - Col	61.5	rev Primer, At5G11790 Fragment B mit SF160, ganzes gDNA Stück mit SF158
SF162	tctcgtctggagttgtgata	Klonierungsprimer	3792961	5	Bur - Col	63	fw Primer, At5G11780 Fragment A mit SF153, ganzes gDNA Stück mit SF165
SF163	acatacaatgtattcggtaagaa	Klonierungsprimer	3795043	5	Bur - Col	62	rev Primer, At5G11780 Fragment A mit SF162
SF164	ttgaaactagtgccctgtgc	Klonierungsprimer	3794955	5	Bur - Col	62.4	fw Primer, At5G11780 Fragment B mit SF165
SF165	ggctcttggttatatggaagt	Klonierungsprimer	3797084	5	Bur - Col	63	rev Primer, At5G11780 Fragment B mit SF164, ganzes gDNA Stück mit SF162
SF166	AGGATTCTACCATTTGTTCTACCA	Sequenzierprimer	3839971	5	Bur - Col	61	fw Primer für Überprüfung von T37 und T11
SF167	ataagccagcccatcct	Sequenzierprimer	3840819	5	Bur - Col	63	rev Primer mit SF166 für Überprüfung von T37 und T12
SF168	tatggcgcgcccATGCCGGGAAATTCTCACC	Klonierungsprimer	Ascl	1	Cvi - Ler	65.5	fw cAt1G23040 aus Cvi und Ler zur Insertion in den pMDC43
SF169	CGCTTAATTAAtcaaagaatcaggaacgccataa	Klonierungsprimer	PacI	1	Cvi - Ler	66	rev c At1G23040 aus Cvi zur Insertion in den pMDC43
SF170	CGCTTAATTAAtcaaagaatcaagaacccataa	Klonierungsprimer	PacI	1	Cvi - Ler	62.9	rev cAt1G23040 aus Ler zur Insertion in den pMDC43
SF171	CGCTTAATTAagaattgctcatcaacgggtag	Klonierungsprimer	PacI	1	Cvi - Ler	66	rev cAt1G23040 aus Ler und Cvi, ohne die GPI Attachment Site, zur Insertion in den pMDC43
SF172	gtcatgtctgaggtcggct	Klonierungsprimer		1	Cvi - Ler	62	rev mit SF030 für Klonierung von g_At1G23040, Ler und Kn-0 version
SF173	CAAGTCCTTGAAGAGG	Sequenzierprimer	11289420	1	Mwg-3	50	fw für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2, alingt in col und Hovdala2,
SF174	tgtgtgttcctacacat	Sequenzierprimer	11290176	1	Mwg-3	48.5	rev für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2 mit SF173, alingt in col und Hovdala2
SF175	TTTAAATCGCCCGGTT	Sequenzierprimer	5329617	2	Mwg-3	58.6	fw für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2, alingt in col und Hovdala2
SF176	aacaagccaactttattcatataag	Sequenzierprimer	5331253	2	Mwg-3	58.3	rev für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2 mit SF175, alingt in col und Hovdala2
SF177	AATGTAGCTGAGCATAAGGC	Sequenzierprimer	11685041	3	Mwg-3	58.3	fw für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2, alingt in col und Hovdala2
SF178	gatgcatttcttgattccat	Sequenzierprimer	11686589	3	Mwg-3	58.6	rev für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2 mit SF177, alingt in col und Hovdala2
SF179	GATTGAAATTGTTTCTTCCAATG	Sequenzierprimer	8006633	4	Mwg-3	60.8	fw für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2, alingt in col und Hovdala2
SF180	tggagcttgtgttaattcttctg	Sequenzierprimer	8007422	4	Mwg-3	61.8	rev für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2 mit SF179, alingt in col und Hovdala2
SF181	GAAAAGCTAAAGGTCATTATAG	Sequenzierprimer	3578255	5	Mwg-3	53.3	fw für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2, alingt in col und Hovdala2

Fortsetzung: Anhang Tabelle 1: Primerliste

SF182	tatagtctcaatataatgatttgg	Sequenzierprimer	3579088	5	Mwg-3	53.4	rev für die Charakterisierung/unterscheidung von Mwg von Hovdala2 mit SF181, alingt in col und Hovdala2
SF183	CCATCTGTGTATCAGAATCGC	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	9023663	1	Mwg-3	61.7	BSAT1.024 fw siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF184	ATGATCCCTCCTCATGCC	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	9023663	1	Mwg-3	62.1	BSAT1.024 rev siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF185	GGACTCGTGCTGCTACATTC	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	12168121	3	Mwg-3	65.7	MSAT3.1 fw siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF186	CCACGCACATGCAATTACATA	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	12168121	3	Mwg-3	63.8	MSAT3.1 rev siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF187	AGAACAAGTTAGGTGGCT	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	13943828	5	Mwg-3	53.3	MSAT5.22 fw siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF188	GGGACAAGATGGAGT	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	13943828	5	Mwg-3	52	MSAT5.22 rev siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF189	TAAGTGCTCTCCAAGTGCAT	Q-PCR		1	Cvi - Ler	62	fw At1G23040 version Ler
SF190	gagagctggcggaggagG	Q-PCR		1	Cvi - Ler	62	rev At1G23040 version Ler
SF191	ACCACCTGCATGTCCTCC	Q-PCR		1	Cvi - Ler	62	fw At1G23040 version Cvi, schlechtes MFold ergebnis
SF192	agatttcccggcggac	Q-PCR		1	Cvi - Ler	62	rev At1G23040 version Cvi, schlechtes MFold ergebnis
SF193	TGTTACATTTACCAACAAAAAATTGT	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	66	mit basta fw Primer für Bur-spezifisches At1G23040 Fragmentes aus den Ler Transgenen
SF194	GCCATTGAATTGATTCTCAAAATTG	Sequenzierungsprimer			Cvi - Ler	66	mit basta fw Primer für eventuell Kn-spezifisches At1G23040 Fragment aus den Ler Transgenen
SF195	AATAGAAATGGAGTTCGACG	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	6402763	2	Mwg-3		MSAT2.28 fw, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF196	TGAACTTGTGTGAGCTTTG	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	6402763	2	Mwg-3		MSAT2.28 rev, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF197	ATCTCATTGAGCTTGCTCC	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	22134691	1	Mwg-3		BSAT1.005 fw, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF198	TGTTACATATCCAGGGTTTGGT	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern		1	Mwg-3		BSAT1.005 rev, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF199	ACACCATAAATGTTTACTCTGC	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	15485041	2	Mwg-3		BSAT2.011 fw, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF200	AACCAACCAAAAGTCAGAACC	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern		2	Mwg-3		BSAT2.011 rev, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF201	GTGAACTGCGGAAGATAAGG	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern	18765366	3	Mwg-3		BSAT3.010 fw, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014
SF202	GCGTTACAAGAGAATGGAGG	AFLP Marker zur Unterscheidung von Ökotypen mit minimaler Anzahl an Markern		3	Mwg-3		BSAT3.010 rev, siehe Cosson <i>et al.</i> 2014



**Anhang Tabelle 2:** Darstellung des Expressionsverhaltens der Gene in Haupt- und Nebencuster. Die Mittlere Signalintensität wurde errechnet als MW der Genexpression aller Gene des Clusters. Diese Werte sind Grundlage für die schematische Darstellung des Expressionsverhaltens in Tabelle 9.

Haupt-cluster	mittlere Singalintensität in				Induktion in	Induktion in	Vergl. Bur- 0/Col-0 unter	Anzahl der
	Bur-0 unter K	Cd	Col-0 unter K	Col-0 unter Cd	Bur-0	Col-0	Cd-Stress	
I	86.4	34.6	116.1	49.7	0.4	0.4	0.7	374
II	27.9	57.2	120.8	89.7	2.0	0.7	0.6	59
III	153.1	80.4	123.9	55.2	0.5	0.4	1.5	812
IV	39.8	142.4	39.5	81.0	3.6	2.1	1.8	887
V	49.7	98.3	71.3	52.9	2.0	0.7	1.9	44
VI	25.6	60.9	32.5	87.2	2.4	2.7	0.7	383

Neben-cluster	mittlere Singalintensität in				Induktion in	Induktion in	Vergl. Bur- 0/Col-0 unter	Anzahl der
	Bur-0 unter K	Cd	Col-0 unter K	Col-0 unter Cd	Bur-0	Col-0	Cd-Stress	
6	89.6	35.8	120.1	49.7	0.4	0.4	0.7	350
13	38.9	17.1	59.0	50.6	0.4	0.9	0.3	24
14	44.1	103.7	99.4	108.7	2.4	1.1	1.0	27
16	14.3	18.0	138.8	73.6	1.3	0.5	0.2	32
2	192.7	178.8	157.6	78.4	0.9	0.5	2.3	53
3	171.1	96.0	161.7	68.2	0.6	0.4	1.4	389
7	98.1	37.3	39.0	37.6	0.4	1.0	1.0	38
9	88.3	30.4	71.2	41.5	0.3	0.6	0.7	187
11	188.2	78.2	100.3	34.4	0.4	0.3	2.3	145
1	45.1	145.0	33.8	58.9	3.2	1.7	2.5	278
5	37.4	141.3	42.1	91.1	3.8	2.2	1.6	609
15	41.0	54.1	70.0	30.5	1.3	0.4	1.8	7
4	51.3	106.7	71.5	57.2	2.1	0.8	1.9	37
8	44.1	39.5	29.4	69.0	0.9	2.3	0.6	11
10	15.1	23.6	28.7	73.5	1.6	2.6	0.3	64
12	27.2	69.4	33.4	90.6	2.6	2.7	0.8	308

**Anhang Tabelle 3:** Gene aus Cluster Analyse in Abbildung 29, welche in einem Abstand von 2 cM zum höchsten LOD-Peak zu finden sind.

AGI	Cluster	Genname(n)	Beschreibung
AT5G10760	1		Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT5G10695	1		unknown protein
AT5G11060	1	KNAT4	KNOTTED1-like homeobox gene 4
AT5G10650	2		RING/U-box superfamily protein
AT5G11650	2		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G11260	3	HY5 TED 5	HY5_TED 5__Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein
AT5G11540	4	GulLO3	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein
AT5G11570	4		Major facilitator superfamily protein
AT5G11180	4	GLR2.6	glutamate receptor 2.6
AT5G11100	4	SYTD NTMC2T2.2 SYT4	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
AT5G11210	5	GLR2.5	glutamate receptor 2.5
AT5G11700	5		unknown protein
AT5G11160	5	APT5	adenine phosphoribosyltransferase 5